

Isolierung und Untersuchung
einer Hybrid-Nuklease
aus dem Rattenleberzytoplasma

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Walter Georg Röwekamp
aus Wien

Marburg/Lahn 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0078

**Isolierung und Untersuchung
einer Hybrid-Nuklease
aus dem Rattenleberzytoplasma**

**INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**von
Walter Georg Röwekamp
aus Wien**

Marburg/Lahn 1973



Vom Fachbereich Chemie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am: 5.12. 1973

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 12. 1973

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Karlson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I EINFÜHRUNG	7
II ERGEBNISSE	10
1. Synthese und Untersuchung des enzymatisch hergestellten Hybrids	10
1.1. Synthese des enzymatischen Hybrids	10
1.2. Untersuchung auf RNase verdaubare RNA	10
1.3. Untersuchung auf RNase resistente doppelsträngige RNA	12
2. Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Hybrid-Nuklease (E.C.3.1.4.34)	14
3. Isolierung der RNase H	14
4. Physikalische und chemische Eigenschaften der Ribonuklease H	23
4.1. Molekulargewichtsbestimmung	23
4.2. Ionenabhängigkeit der enzymatischen Katalyse	24
4.3. pH-Abhängigkeit der Reaktion	24
4.4. Weitere allgemeine Eigenschaften des Enzyms	25
4.5. t/P und e/v-Diagramm	29
5. Prüfung auf Homogenität der Enzympräparation	30
6. Ermittlung der Enzymuntereinheiten	32
7. Untersuchungen zur Enzymwirkung	33
7.1. Ausschluß von Fremdaktivitäten und Nachweis der Substratspezifität	33
7.2. Endonukleolytischer Spaltungsmechanismus	34
7.3. Kettenlänge der Endprodukte nach enzymatischer Hydrolyse	36
7.4. Spaltung der 3'-Phosphodiesterbindung und Basenspezifität	36
III DISKUSSION	42
IV ZUSAMMENFASSUNG	49

	Seite
V BESCHREIBUNG DER VERSUCHE	50
1. Material und allgemeine Arbeitsmethoden	50
1.1. Verwendete Substanzen, Puffer und Enzyme	50
1.2. Allgemeine Bestimmungsmethoden	51
1.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit radioaktivem Substrat	52
2. Darstellung der Substrate	53
2.1. Enzymatische Synthese des DNA-RNA Hybrids	53
2.2. Synthetische Homopolymerhybride	54
3. Isolierungsverfahren der RNase H	56
4. Molekulargewichtsbestimmung der RNase H	60
4.1. Sucrosegradientenzentrifugation	60
4.2. Sephadex G-200 Chromatographie	61
5. Ermittlung der Enzymuntereinheiten	61
5.1. Davis Acrylamid Gelelektrophorese	61
5.2. Elution der enzymatischen Aktivität von DAVIS-Gelen	62
5.3. SDS-Acrylamid Gelelektrophorese	63
6. Kettenlängenbestimmung der Endprodukte der Enzymreaktion	63
7. Spaltung der 3'-Phosphodiesterbindung und Basenspezifität	65
7.1. Synthese des doppeltmarkierten Hybrids	65
7.2. Chromatographie der enzymatischen Spalt- produkte nach alkalischer Hydrolyse auf PEI - Zellulose	66
8. Isoelektrische Fokussierung	67
 VI LITERATUR	 69

ERLÄUTERUNG DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AF/013	O-n-octyloxim des 3-formyl-Rifamycin SV
ATP	Adenosintriphosphat
CM-Zellulose	Carboxymethyl-Zellulose
cpm	gezählte Impulse pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
d	spezifische Dichte
DE-Zellulose	Diäthylamino-Zellulose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E.-Coli	Escherichia Coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
e/v	Enzymmenge/Geschwindigkeits-Kinetik
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Ip	isoelektrischer Punkt
OD	optische Dichte
PCA	Perchlorsäure
PE-Zellulose	Polyäthylenimin-Zellulose
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Polymerase	DNA-abhängige RNA Polymerase
S	Sedimentationskonstante
SDS	Natriumlaurylsulfat = Natriumdodecylsulfat
Sucrose	Rohrzucker
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
t/p	Zeit/Produkt-Kinetik
tRNA	transfer-RNA
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV-Messung	ultraviolette Licht

I EINFÜHRUNG

Die Hybrid-Nuklease (E.C. 3.1.4.34) oder Ribonuklease H hydrolysiert spezifisch den RNA-Strang von DNA-RNA-Hybriden. Solche RNase H Aktivitäten sind in verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Systemen nachgewiesen worden, zuerst im Kalbsthymus (1,2), später in KB-Zellen (3), Hühner-Embryonen (4), Hefe (5), Insekten (6) und im Avian myeloblastosis Virus (AMV-Virus) (7).

Das natürliche Substrat dieser Enzyme fand schon in den 60iger Jahren reges Interesse in verschiedenen Arbeitsgruppen. So glaubte man zunächst, daß grundsätzlich bei der Umsetzung der genetischen Information intermediär DNA-RNA Hybride gebildet werden (8,9,10,11,12). Diese Hypothese mußte aber bald revidiert werden, nachdem sich bei eingehender Untersuchung der Transkription herausstellte, daß während der Synthese an doppelsträngiger DNA keine stabilen Hybride entstehen (13,14). Diese ließen sich nur durch Polymerisation der Nukleosidtriphosphate an einzelsträngiger DNA in vitro herstellen (15, 16,17,18,19). Durch die Entdeckung der RNA abhängigen DNA-Polymerase im Avian myeloblastosis Virus, kurz "Reverse Transkriptase" genannt (20), wurde das Interesse an Hybriden in Richtung Replikation gelenkt, denn bei der Umsetzung der Information von Virus-RNA in doppelsträngige DNA tritt immer als frühes Zwischenprodukt ein DNA-RNA-Hybrid auf (21,22,23). Diese hybridisierte RNA muß vermutlich vor Verdoppelung des DNA-Moleküls enzymatisch hydrolysiert werden. Nach der Entdeckung der Kalbsthymus-RNase H durch STEIN und HAUSEN (1,2) fand man auch kurze Zeit später im AMV-System eine Hybrid-Nukleaseaktivität. Diese konnte weder in einem der üblichen Reinigungsverfahren, noch durch Zerlegung des gereinigten Enzyms in die Unter-einheiten von der polymerisierenden Aktivität abgetrennt

werden (7,24). Da außerdem von verschiedenen Autoren DNA-RNA Hybride, z.T. im Zusammenhang mit der DNA-Replikation, nachgewiesen worden sind (8,9,10,11,12,25), scheint die Funktion einer Hybrid-Nuklease im prokaryotischen System ausreichend gedeutet zu sein. Es ist aber bisher nicht geklärt, welche Rolle sie in der eukaryotischen Zelle spielt. Eine sinnvolle Funktion kann der Ribonuklease H hier nur zugeordnet werden, wenn ihr Substrat und dessen Funktion ebenfalls nachgewiesen werden kann. Leider gibt es bis jetzt weder für eine funktionelle Rolle beim Replikations- noch beim Transkriptionsprozess experimentelle Hinweise.

Das von BRITTON und DAVIDSON (26) entworfene Genregulationsmodell für höhere Zellen bietet allerdings eine gute Arbeitshypothese für die Untersuchung von DNA-RNA Hybriden in eukaryotischen Organismen. Dieses Modell postuliert eine Korrelation von Zelldifferenzierung und Regulation der Genaktivität, so daß für jedes Differenzierungsstadium jeweils eine bestimmte Gruppe von Genen für die Transkription zur Verfügung steht. Diese Feststellung läßt sich teils direkt, teils indirekt aus bekannten Befunden ableiten. Alle Zellen eines Organismus besitzen identische Genome (27,28), von diesen ist aber der größte Teil genetisch inaktiv (29,30); andererseits synthetisieren verschiedene Zelltypen eines Organismus auch unterschiedliche RNA (31,32). BRITTON und DAVIDSON folgern daraus, daß wahrscheinlich alle Gene primär inaktiviert sind, solange sie nicht durch äußere Induktoren, wie zum Beispiel Hormone oder andere "aktive" Moleküle über mehrere Stufen, zuletzt durch eine sogenannte "Aktivator RNA", aktiviert werden. Somit ist die entscheidende Reaktion, welche zur Freigabe der genetischen Information der Producingene führt, die Bindung der "Aktivator RNA" an die komplementäre Sequenz eines Receptorgens in Form eines DNA-RNA Hybrids.

Solange sich daher das Receptorgen im aktivierten Zustand befindet, ist die Information des benachbarten Producingens verfügbar. Da die Umsetzung der Information des Producingens nur durch Entfernung der Hybrid - "Aktivator-RNA" beendet werden kann, wäre die in verschiedenen Organismen beschriebene Hybrid-Nuklease das geeignete Enzym, um diese wichtige Schlüsselfunktion auszuüben. Um diese Hypothese experimentell zu prüfen, war es zunächst notwendig, die Existenz des Enzyms in der Rattenleber nachzuweisen, es anschließend bis zur Abtrennung von störenden Fremdaktivitäten zu reinigen und zu charakterisieren.

Zu Beginn dieser Arbeit lag allein die Veröffentlichung von STEIN und HAUSEN über eine Hybrid-Nuklease im Kalbsthymus vor (1,2). Die Verfasser führten allerdings nur eine grobe Reinigung mittels $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung und DE-Zellulosechromatographie aus dem Gesamtgewebe durch. Es mußte daher zunächst ein neuer Präparationsgang erarbeitet werden, zumal die RNase H in der Rattenleber hauptsächlich in der cytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden konnte.

II ERGEBNISSE

1. Synthese und Untersuchung des enzymatisch hergestellten Hybrids

1.1. Synthese des enzymatischen Hybrids

Das am häufigsten verwendete Substrat dieser Arbeit ist ein DNA-RNA Hybrid, welches in Anlehnung an die Methode von Stavrianopoulos et al (33) durch Polymerisation der vier Nukleosidtriphosphate an einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA unter Zusatz von tritiummarkiertem UTP hergestellt wurde. Durch Schütteln des Enzymansatzes mit einer Chloroform / Isoamylalkohol Mischung wird die enzymatische Synthese von RNA gestoppt und gleichzeitig das Protein denaturiert. Nicht inkorporiertes ^3H UTP wird durch Dialyse, nicht hybridisierte RNA weitgehend durch Chromatographie an Biogel A-1,5m entfernt. (Abb. 1) (Einzelheiten siehe exp.Teil)

1.2. Untersuchung auf RNase verdaubare RNA

Das so gewonnene Hybrid wurde zunächst auf seine Resistenz gegenüber pankreatischer RNase geprüft. Dazu wurde es unter geeigneten Bedingungen (siehe Abb. 2) mit pankreatischer RNase inkubiert.

Die Abbildung zeigt, daß die hybridisierte RNA fast zu 100 % resistent gegenüber einem Angriff von pankreatischer RNase ist, während sie nach Ablösen von der DNA von der gleichen Menge RNase (1 μg / ml) vollständig hydrolysiert wird.

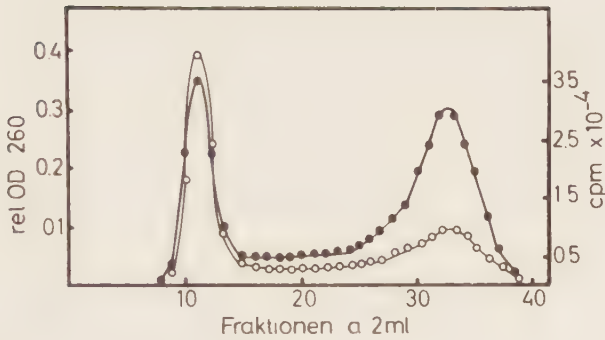


Abb. 1 Reinigung des DNA-RNA Hybrids durch Gelfiltration in einer Biogel A-1,5m Säule (1,7 x 30 cm)

○ — ○ OD bei 260 nm
● — ● cpm von 10 μ l

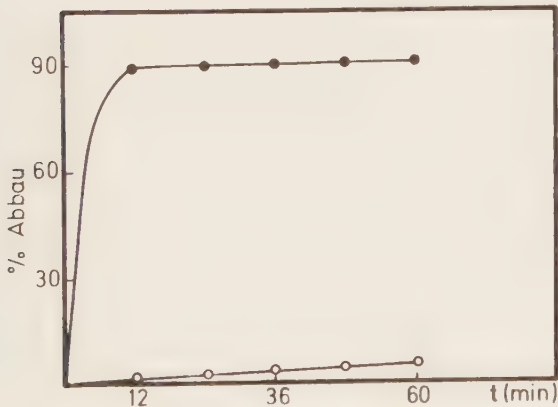


Abb. 2 Untersuchung des Hybrids auf freie RNA mit pankreatischer RNase

○ — ○ Inkubation des nativen Hybrids mit 1 μ g/ml RNase
● — ● Inkubation eines durch Erhitzen denaturierten Hybrids mit 1 μ g/ml RNase

1.3. Untersuchung auf RNase resistente doppelsträngige RNA

Da bei der Synthese des Hybrids durch Selbsthybridisierung auch doppelsträngige RNA gebildet werden kann (34), muß

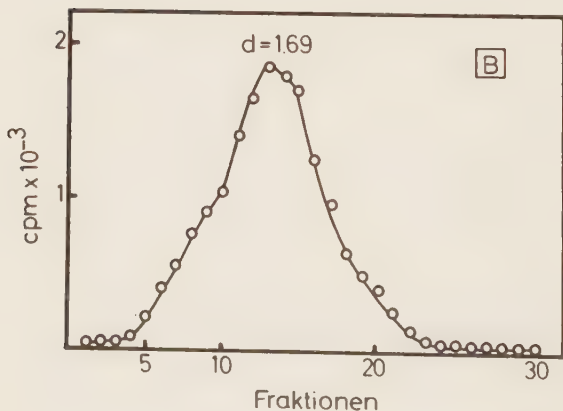
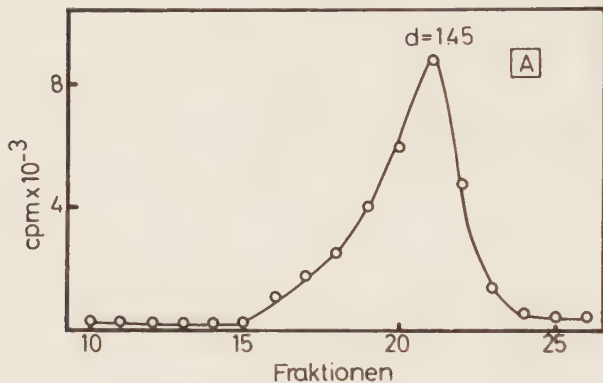


Abb. 3
Zentrifugation
des gereinigten
Hybrids in CsSO_4
(A) und CsCl (B)-
Dichtegradienten.
Das Hybrid wurde
50 Stunden bei
40.000 UpM in
einem SW 56 Beck-
mann Rotor zen-
trifugiert. Die
Dichtemedien waren
wie folgt zusammen-
gesetzt.

A. 1,65 ml Phos-
phatpuffer
(0,1 M, pH 6,8)
2,25 ml einer
gesättigten
 CsSO_4 Lösung in
destilliertem
Wasser,
0,3 ml Formal-
dehyd (35%) und
0,2 ml DNA-
RNA-Hybrid

B. 4,05 g CsCl ,
0,05 ml DNA-
RNA-Hybrid,
0,3 ml Formal-
dehyd und
3,65 ml Tris-
HCl Puffer
(67mM; pH 7,9)

auch auf diese Verunreinigung geprüft werden. Diese RNA wird ebenso wie das Hybrid nicht von pankreatischer RNase hydrolysiert und muß daher mit einer anderen Methode nachgewiesen werden. Da DNA, DNA-RNA Hybride und RNA in der Dichtegleichgewichtszentrifugation an verschiedenen Stellen des Gradienten erscheinen, ist dieses Verfahren für diesen Zweck am besten geeignet.

Für die Kalbsthymusnukleinsäuren werden von Szybalski (35) folgende Werte in Dichtegradienten angegeben.

	CsSO ₄ g/ml	CsSO ₄ g/ml (+ HCHO)	CsCl
DNA (denaturiert)	1.451	1.448	1.69
DNA : RNA Hybrid (1:1)	1.490	1.487	
RNA (einzelnsträngig)	1.550	1.520	

Wie die Abbildungen 3 A und B zeigen, erscheint das Hybrid jeweils bei der Dichte für DNA. Allerdings muß dieser Wert um etwa 0.03 zu geringerer Dichte korrigiert werden, da den Gradienten Formaldehyd zugesetzt war, welches bekanntlich die Wasserstoffbrücken aufhebt und so die Packungsdichte der Nukleinsäuren verringert. Der Aktivitätspeak der CsSO₄ Gleichgewichtszentrifugation weist zum dichteren Teil des Gradienten eine kleine Schulter auf, welche man als geringe Verunreinigung mit doppelsträngiger RNA interpretieren könnte. Wahrscheinlich entstehen bei der Synthese des Hybrids einige sehr lange RNA-Ketten, welche bei der Gelfiltration zusammen mit dem Hybrid im Ausschlußvolumen eluieren und durch Selbsthybridisierung in doppelsträngige RNA übergehen.

2. Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Hybrid-Nuklease (E.C. 3.1.4.34)

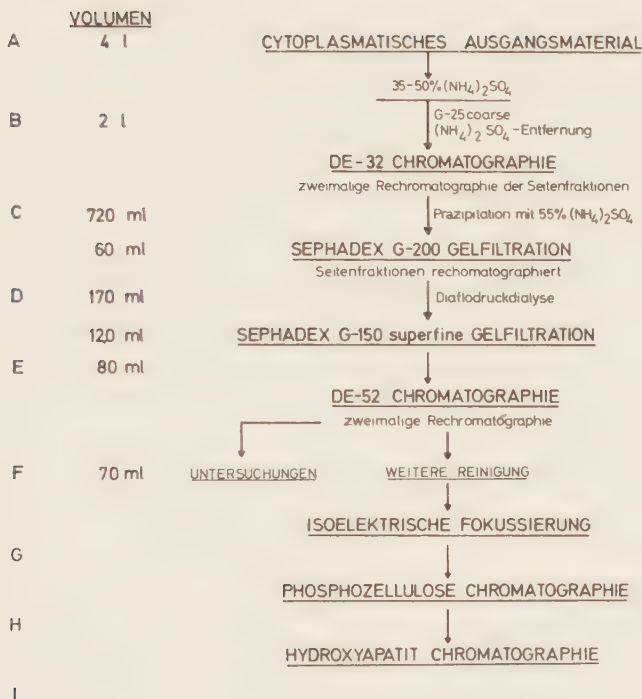
Die Enzymaktivität wird als Verminderung der säurepräzipitierbaren RNA eines DNA-³H RNA Hybrids nach zehnminütiger Inkubation bei 37°C ausgedrückt.

Zur Aktivitätsbestimmung wird radioaktives Hybrid unter optimalen pH- und Ionenbedingungen (siehe II 4.2. und 4.3.) mit Enzym bzw. Puffer A inkubiert. Die Enzymfraktion muß jeweils so verdünnt werden, daß im Verlauf einer halben Stunde nicht mehr als 40 % der hybridisierten RNA zu säurelöslichem Material hydrolysiert wird. Das nichthydrolysierte Substrat wird dann auf Filterplättchen präzipitiert und wie im exp. Teil beschrieben weiterbehandelt. Aus der Differenz der Radioaktivität zwischen der Kontrolle (Puffer A) und einer mit Enzym behandelten Probe ergibt sich die Enzymaktivität. Als Einheit E (Laborhilfseinheit) wird die Enzymmenge definiert, die in 10 Minuten Inkubation bei 37°C 1500 cpm hybridisierter RNA (entsprechend 0,03 µg bzw. 100 pMol Nukleotidbausteine) zu säurelöslichen Nukleotiden hydrolysiert.

3. Isolierung der RNase H

Zur Isolierung der RNase H wurde nach entsprechenden Vorversuchen ein Anreicherungsverfahren ausgearbeitet, das in Form eines Diagramms in Abb. 4 wiedergegeben ist. Bei einigen Anreicherungsschritten mußten Aktivitätsverluste des Enzyms in Kauf genommen werden. Manche der üblichen Reinigungsverfahren schieden wegen weitgehender Inaktivierung des Enzyms aus.

Die Enzympräparation der Stufe F wurde für die Untersuchung der enzymatischen Wirkungsweise verwendet. Die weiteren Reinigungsschritte bis zur Stufe I brachten hohe Inakti-



vierungsraten, lieferten jedoch für die Untersuchung der proteinchemischen Eigenschaften ein geeignetes, fast homogenes Präparat.

Für die Einzelschritte gilt folgendes:

Aus Lebern von jungen Ratten werden die Kerne, Mitochondrien, Lysosomen und Ribosomen durch differentielle Zentrifugation entfernt (siehe exp. Teil). Der verbleibende

lösliche cytoplasmatische Überstand dient als Ausgangsmaterial für die Isolierung der RNase H.

Das Enzym wird zunächst durch Fällung mit festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zwischen 35 und 50 % Sättigung angereichert (siehe Abb. 5). Das Sediment mit etwa 90 % der ursprünglichen Nukleaseaktivität wird in Puffer A aufgenommen und durch Gelfiltration in einer Sephadex G-25 coarse Säule (mit Puffer A äquilibriert) von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ befreit. Bei dem gewählten pH läßt sich die RNase H an einer DE-32 Anionenaustauschersäule adsorbieren. Nach dem Auswaschen nichtbindender Begleitproteine wird mit einem linearen Salzgradienten ein breiter Aktivitätspeak bei einer Molarität von 80 mM NH_4Cl eluiert. (siehe Abb. 6)



Abb. 5 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung der Ribonuklease H aus dem cytoplasmatischen Überstand
○ — ○ Enzymaktivität im zentrifugierten Überstand
● — ● Enzymaktivität in den $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Präzipitaten.

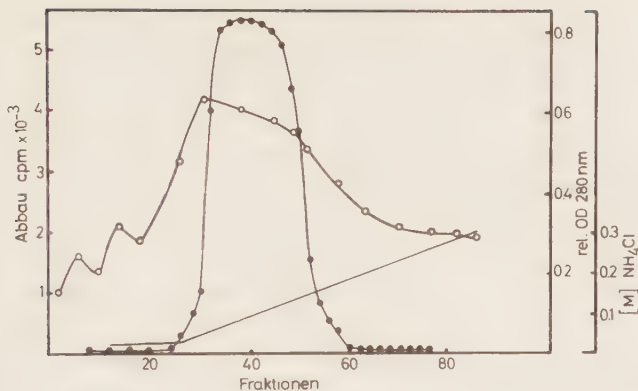


Abb. 6 Chromatographie der RNase II (Stufe B) an einer DE-32 Anionenaustauscher Säule

- relative OD bei 280 nm
- Enzymaktivität von 2 µl
- NH₄Cl-Konzentration

(vergleiche V.3.)

Es werden nur die Fraktionen mit der höchsten Aktivität entsprechend 30 - 40 % des eluierten Enzymberges vereinigt. Dieses Verfahren wird mit den Seitenfraktionen unter den gleichen Bedingungen an kleineren DE-32 Säulen zweimal wiederholt. Dadurch wird schon frühzeitig die Hauptmenge der Begleitproteine entfernt, so daß bei der folgenden Chromatographie an Sephadex G-200 schon ein befriedigendes Verhältnis von Probenauftrapsvolumen und Säulengröße gegeben ist. Die drei Fraktionen aus der DE-Chromatographie werden vereinigt und die Proteine mit (NH₄)₂SO₄ bei 55 % Sättigung gefällt. Der Niederschlag wird in einer möglichst geringen Menge von Puffer A + 0,4 M NH₄Cl gelöst und in einer Sephadex G-200 Säule mit einmaliger Rechromatographie, wie zuvor beschrieben, nach Molekülgröße aufgetrennt. (siehe Abb. 7)

Wie das Bild zeigt, wird in diesem Reinigungsschritt der überwiegende Teil der Begleitproteine abgetrennt; dennoch zeigt die RNase H Präparation hier noch DNase und RNase Fremdaktivität.

Mit dieser Fraktion wurden verschiedene weitere Anreicherungs-schritte mit folgenden Ergebnissen versucht:

Präparative Gelelektrophorese (keine enzymatische Aktivität zurückerhalten),

Isoelektrische Fokussierung (Anreicherung, aber Aktivitätsverlust),

Affinitätschromatographie an DNA-Agarose, CM-Zellulose Chromatographie (wenig Aktivitätsverluste, aber kein Reinigungseffekt),

Phosphozellulose- und Hydroxyapatitchromatographie (sehr gute Reinigung - hohe Aktivitätsverluste). Die bedingt geeigneten Schritte (Isoelektrische Fokussierung, Phosphozellulose und Hydroxyapatitchromatographie) wurden nur zur Aufklärung der Enzymuntereinheitenstruktur ausgeführt.

Eine weitere Anreicherung der RNase H ohne Aktivitätsverluste kann aber durch erneute Gelfiltration in einem hierfür günstigeren Trennbereich mit einer Sephadex G-150 superfine Chromatographie erzielt werden. Gleichzeitig läßt sich in diesem Reinigungsschritt die störende Fremdnukleaseaktivität entfernen.

Diese Abtrennung ist allerdings nur durch das vorhergehende aufwendige Rechromatographieverfahren gewährleistet. Es erniedrigt die Proteinkonzentration so weit, daß die Auftragsmenge für die Sephadex G-150 superfine Chromatographie durch Diaflodruckdialyse auf 1,5 % des Säulenvolumens reduziert werden kann.

Anschließend wurde versucht, an einem feinkörnigen und besser auftrennenden DE-52 Präparat mit einem sehr flachen Salzgradienten eine weitere Reinigung zu erzielen.

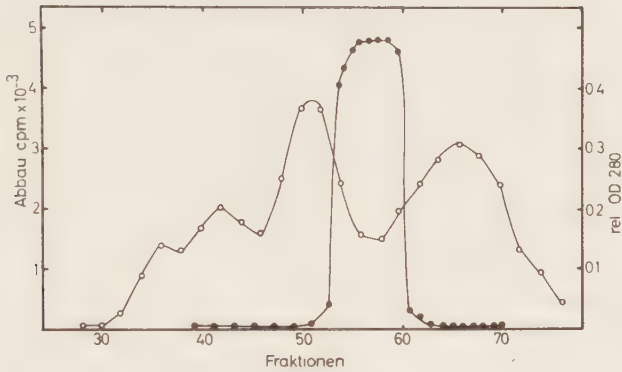


Abb. 7 Gelfiltration der RNase H (Reinigungsstufe C) in einer Sephadex G-200 Säule

○—○ relative OD bei 280 nm
●—● Enzymaktivität von 2 μ l
(vergleiche V.3.)

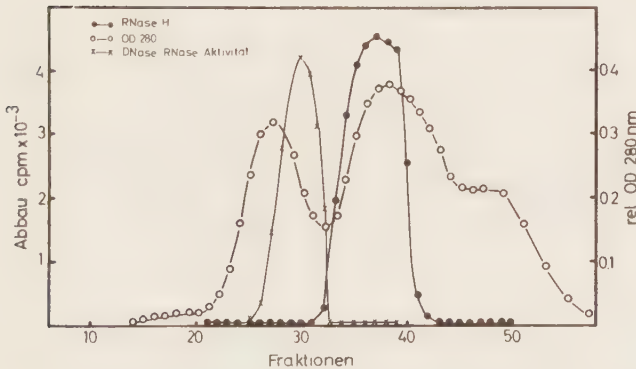


Abb. 8 Gelfiltration der RNase H (Reinigungsstufe D) in einer Sephadex G-150 superfine Säule

○—○ relative OD bei 280 nm
●—● Enzymaktivität von 2 μ l
x—x DNase- bzw. RNase Aktivität von 10 μ l

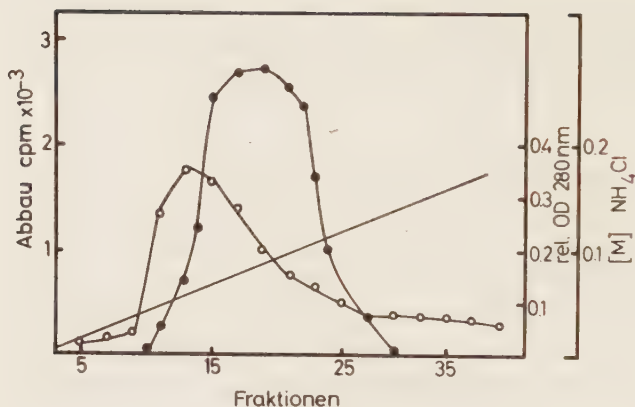


Abb. 9 Chromatographie der RNase H (Reinigungsstufe E) an einer DE-52 Anionenaustauscher Säule

○ — relative OD bei 280 nm
 ● — Enzymaktivität von 2 µl
 — NH₄Cl Konzentration
 (vergleiche V.3.)

Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der Chromatographie.

Da sich auch hier eine beträchtliche Enzymreinigung erreichen läßt, wurde auch dieser Schritt, wie bei der ersten DE-Zellulose-Chromatographie, zweimal wiederholt. In diesem Reinigungsstadium ist die Ribonuklease H frei von störenden Fremdaktivitäten und kann daher zur Untersuchung ihrer Eigenschaften und Spezifität verwendet werden.

Ein Teil der aus der DE-52 Chromatographie erhaltenen Enzymfraktion wird mit isoelektrischer Fokussierung, Phosphozellulose- und Hydroxyapatitchromatographie trotz nahezu vollständigem Aktivitätsverlust weitergereinigt, um die Untereinheitenstruktur des Enzyms aufzuklären.

Dazu wird die Enzymprobe nach Dialyse gegen eine einprozentige Glycinlösung entsprechend der Arbeitsvorschrift des Herstellers in einer LKB Ampholine Säule elektrofokussiert. Abweichend wird zur Stabilisierung der Proteinbanden ein Glyceringradient von 70 - 5 % verwendet, da beim Kontakt mit Sucrosemedien das Enzym unerklärliche Aktivitätsverluste erleidet.

Wie Abbildung 10 zeigt, wird die RNase H bei einem isoelektrischen Punkt von pH 6,5 fokussiert.

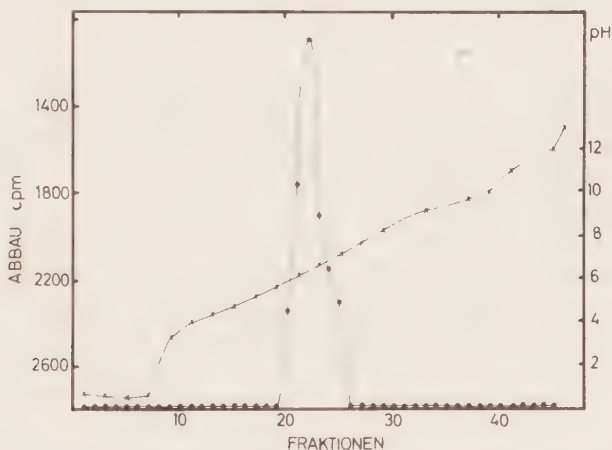


Abb. 10 Isoelektrische Fokussierung der RNase H (Reinigungsstufe F) in der LKB 8101 Ampholine Elektrofokussierungssäule
● — ● Enzymaktivität von 20 µl
— pH-Gradient
(vergleiche V.8.)

Die aktiven Fraktionen der isoelektrischen Fokussierung werden gesammelt, zweimal gegen 10 Volumina Puffer A dialysiert und an einer Phosphozellulosesäule adsorbiert. Die enzymatische Aktivität wird mit einem linearen Salzgradienten bei einer Molarität von 0,26 M NH_4Cl eluiert. (siehe Abb. 11)

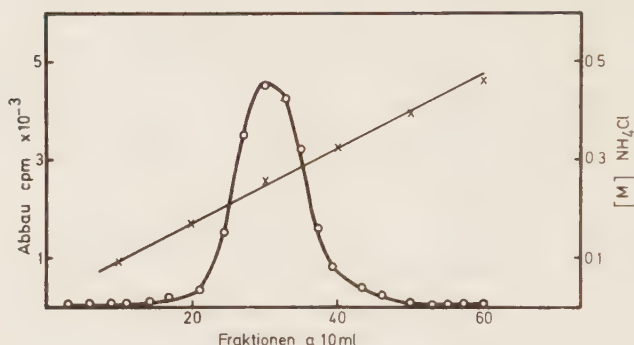


Abb. 11 Chromatographie der RNase H (Reinigungsstufe G)
an einer Phosphozellulosesäule
○—○ Enzymaktivität von 100 µl
x—x NH₄Cl-Konzentration
(vergleiche V. 3.)

Der Bereich mit RNase H Aktivität wird vereinigt, mit zweimaligem Wechsel gegen 20 Volumina Phosphatpuffer dialysiert und auf eine Hydroxyapatitsäule aufgetragen. Die Elution des Enzyms läßt sich mit einem Na-Phosphatgradienten durchführen.

Zur Aktivitätsbestimmung müssen die Fraktionen allerdings vorher mehrmals gegen Puffer A dialysiert werden, um die stark hemmenden Phosphationen zu entfernen und den erforderlichen pH von 7,9 einzustellen.

Wie später gezeigt werden wird, zeigt die Acrylamid Gelelektrophorese hauptsächlich die RNase H Bande, aber die Aktivität des Enzyms ist in den letzten Reinigungsschritten nahezu vollständig verloren gegangen.

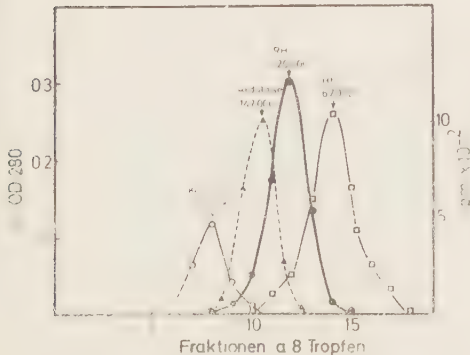
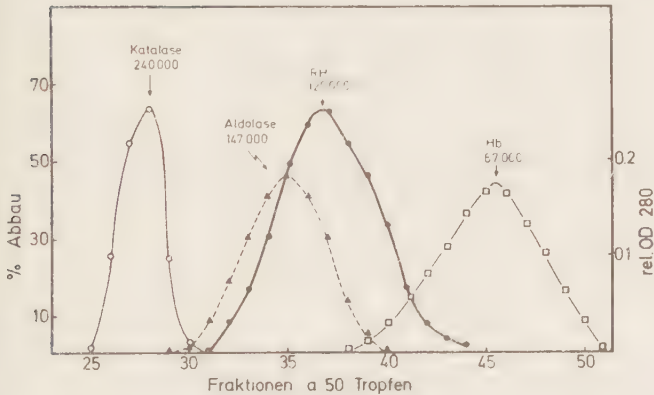
4. Physikalische und chemische Eigenschaften der Ribonuklease H

4.1. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht wurde mit der Enzymfraktion aus der DE-52 Chromatographie (Reinigungsstufe F) bestimmt. Als Eichsubstanzen wurden Hämoglobin (67.000), Aldolase (147.000) und Katalase (240.000) verwendet. Aus Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugationen ergibt sich ein Molekulargewicht von 120.000 Dalton, aus G-200 Gelfiltrationen von 125.000 Dalton (siehe Abb. 12).

Abb. 12

Molekulargewichtsbestimmung der RNase H (Reinigungsstufe F) durch Sephadex G-200 Gelfiltration (oben) und Sucrosegradientenzentrifugation (unten) vergleiche V.4.)



4.2. Ionenabhängigkeit der enzymatischen Katalyse

Durch Veränderung des Standardenzymansatzes wurde das Optimum der Abhängigkeit der Enzymreaktion von zweiwertigen Ionen, hier Mg^{2+} und Mn^{2+} bestimmt. Das Optimum der enzymatischen Katalyse wurde bei $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mg^{2+} und $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ Mn^{2+} ermittelt. (siehe Abb. 13). Durch Zusatz von EDTA läßt sich die Aktivierung rückgängig machen.

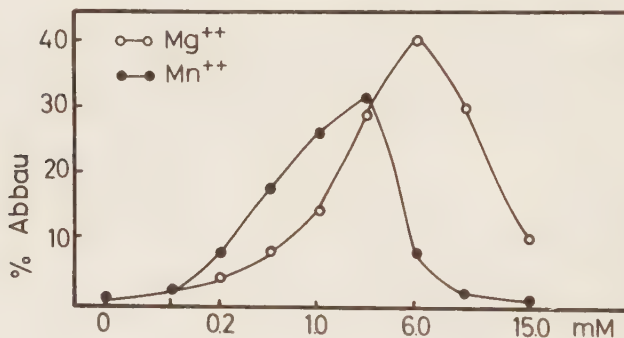


Abb. 13 Abhängigkeit der enzymatischen Katalyse von Mg^{2+} und Mn^{2+} Ionen.

4.3. pH-Abhängigkeit der Reaktion

Das pH-Optimum wurde durch Einstellen des Standardansatzes mit Tris-HCl auf verschiedene Wasserstoffionenkonzentrationen zwischen pH 7,1 und 9,5 bestimmt

(siehe Abb. 14). Das Maximum der enzymatischen Katalyse ergibt sich zwischen pH 7,7 und 8,2. Unterhalb von pH 7,0 läßt sich mit einem Acetatpuffersystem keine Aktivität nachweisen.

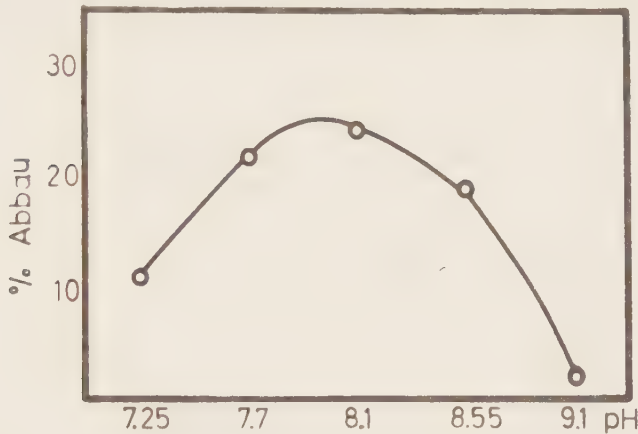


Abb. 14 Abhängigkeit der enzymatischen Katalyse vom pH-Wert in einem Tris-HCl Puffersystem

4.4. Weitere allgemeine Eigenschaften des Enzyms

Das Enzym der Reinigungsstufe F zeigt beim Stehen bei 0°C innerhalb von 4 Wochen oder 24 Stunden bei Raumtemperatur keinen merklichen Aktivitätsverlust. Der Einfluß von Salzen und Inhibitoren ist zusammen mit den schon beschriebenen Eigenschaften des Enzyms in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Bemerkenswert ist die Hemmung durch AF/O13 (die Formelbilder der verwendeten Inhibitoren siehe Seite 27 und 28). Da dieser Hemmstoff als spezifischer Inhibitor der RNA-Polymerasen gilt, lassen sich vielleicht ähnliche Strukturmerkmale im Enzymaufbau postulieren.

Eigenschaften der Ribonuklease H

MG	125.000	G-200 Gelfiltration
MG	120.000	Zuckerdichtegradientenzentrifugation

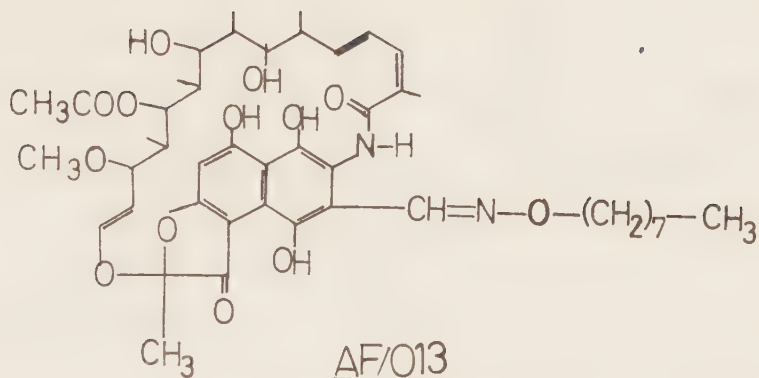
Ip pH 6,5

pH Optimum pH 7,7 - 8,2

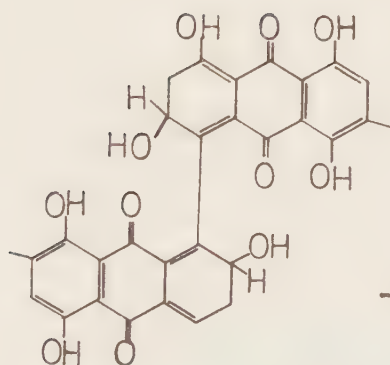
strikte Abhängigkeit von der Anwesenheit bivalenter Metallionen

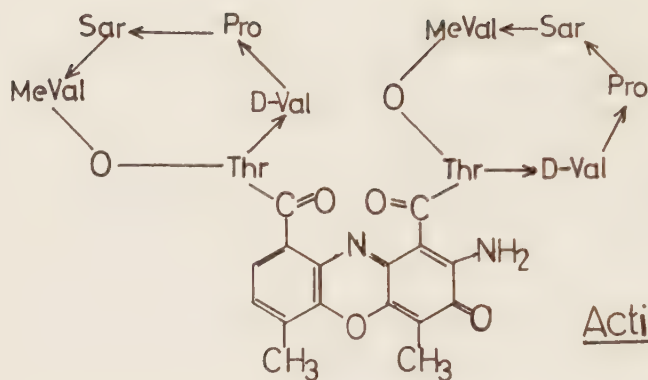
	MgSO ₄	6 x 10 ⁻³ M
Optimum für	MnSO ₄	2 x 10 ⁻³ M

Inhibitoren	% Hemmung
p-Chlormercuribenzoat 5 x 10 ⁻³ M	80
NaCl 0,1 M	25
NaCl 0,25 M	85
t-RNA 500-facher Überschuß	0
einzelsträngige DNA 500-facher Überschuß	0
AF/013 20 µg / ml	80
200 µg / ml	95
a-Amanitin 5 µg / ml	0
Luteoskyrin 50 µg / ml	0
Lucanthon 50 µg / ml	0
Actinomycin D 50 µg / ml	0

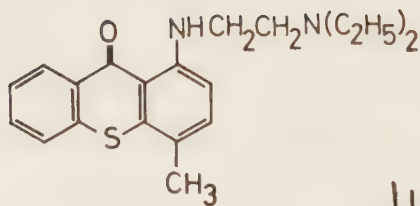


(O-n-octyloxim des 3-formyl
Rifamycin SV)

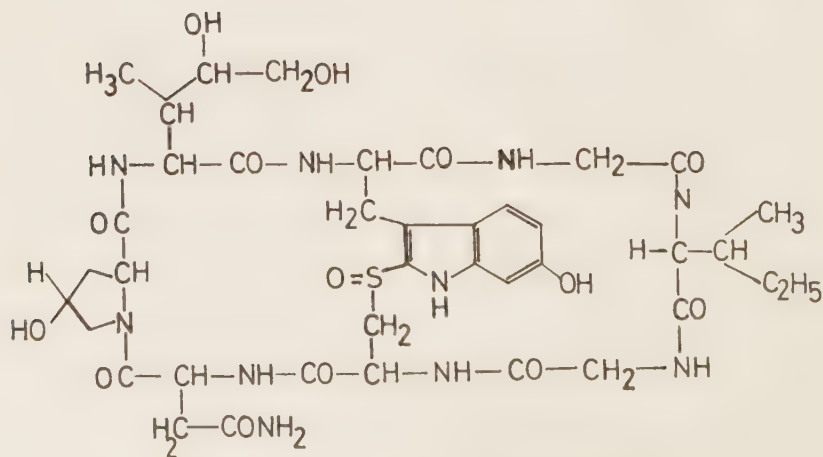




Actinomycin D



Lucanthon



α -Amanitin

4.5. t/P und e/v-Diagramm

In der rechten Kinetik der Abbildung 15 ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit v von der Enzymmenge e aufgezeigt. Man erkennt, daß die Reaktion bei etwa 50% Abbau des Hybrids scheinbar ein Plateau erreicht.

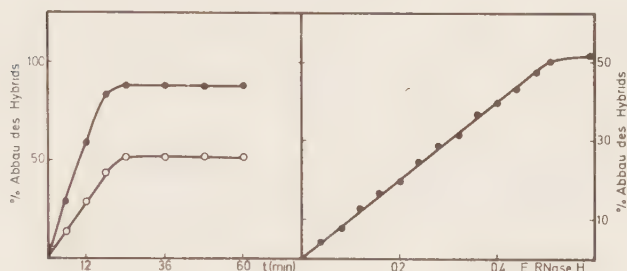


Abb. 15 In der rechten Bildhälfte ist die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit (v) von der Enzymmenge (e) dargestellt, in der linken das Zeit-Produkt-Diagramm $\circ$ — $\circ$ und die gleiche Kinetik nach Behandlung der Produkte mit pankreatischer RNase $\bullet$ — $\bullet$. Die kinetischen Daten der t/P-Abhängigkeit wurden mit folgendem Ansatz ermittelt: 15-facher Standardansatz mit 3,4 E RNase H, in der zweiten Kinetik (schwarze Kreise) wurde die RNase H Aktivität jeweils durch 100 $\mu\text{g/ml}$ AF/O13 gehemmt und anschließend die freien Oligonukleotide durch Zusatz von 0,2 mE pankreatischer RNase verdaut.

Untersucht man das "verbleibende Hybrid" und die gebildeten Produkte mittels einer Gelfiltration (z.B. wie in II. 7.2. beschrieben), so muß man feststellen, daß zu diesem Zeitpunkt fast keine hybridisierte RNA mehr im Ansatz vorhanden ist.

Es wurde daher vermutet, daß diese Differenz im Testsystem begründet liegt. Da wahrscheinlich als Endprodukte der Enzymreaktion auch Oligonukleotide mit Kettenlängen um $N = 10$ gebildet werden (dann dissoziieren sie nämlich von der DNA ab), erscheinen diese im Test als nicht umgesetztes Substrat. (Decanukleotide lassen sich auf Papierblättchen in TCA schon präzipitieren)

Diese Interpretation konnte mit den in Abbildung 15 dargestellten Kinetiken (links) bestätigt werden. In der t/P-Abhängigkeit sieht man erneut, daß sich das Hybrid scheinbar nicht weiter als zu 50 % hydrolysieren läßt (offene Kreise). Stoppt man die RNase H Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe des spezifischen Inhibitors AF/013 und hydrolysiert dann die freien nicht-hybridisierten Oligonukleotide mit pankreatischer RNase, so erhält man die Kurve mit den geschlossenen Kreisen.

5. Prüfung auf Homogenität der Enzympräparation

Die Reinigung der Ribonuklease H wurde in den letzten Präparationsstufen mit Hilfe der Acrylamid-Gelelektrophorese nach DAVIS (36) verfolgt.

Abbildung 16 A zeigt die Enzymfraktion nach DE-52 Chromatographie, Abbildung 16 B nach weiterer Reinigung durch isoelektrische Fokussierung.



Abb. 16 Acrylamid Gelelektrophorese der RNase H nach DE-52 Chromatographie (A) und nach dem nächsten Reinigungsschritt, der isoelektrischen Fokussierung (B). Die aktiven Proteinbanden sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. (vergleiche V. 5.1.)

Die enzymatische Aktivität ließ sich der langsamsten Proteinbande durch Elution des Enzyms aus dem Gel zuordnen (siehe Pfeil)

Dazu wurden die Gele über Nacht bei niedriger Stromstärke vorelektrophoresiert, um Ammoniumpersulfat und nichtpolymerisierte Ausgangssubstanzen zu entfernen.

Die Elektrophorese mit der Enzympräparation der Reinigungsstufe F wurde anschließend, wie im exp. Teil beschrieben (vergleiche V. 5.2.), im Kühlraum durchgeführt. Ein Teil der Gele wurde angefärbt, ein anderer in einer Gelschneidemaschine fraktioniert. Nach zweistündiger Elution durch Diffusion mit Puffer A konnte in den Fraktionen enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. (siehe Abb. 17)

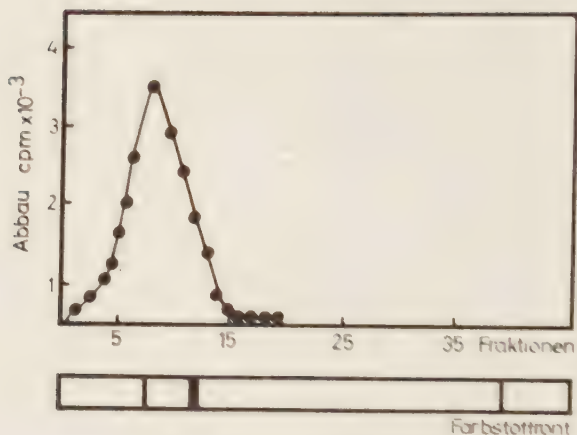


Abb. 17 Identifizierung des Enzyms (Reinigungsstufe F) in DAVIS-Gelen durch Elution der enzymatischen Aktivität aus dem fraktionierten Gel (vergleiche V. 5.2.)

6. Ermittlung der Enzymuntereinheiten

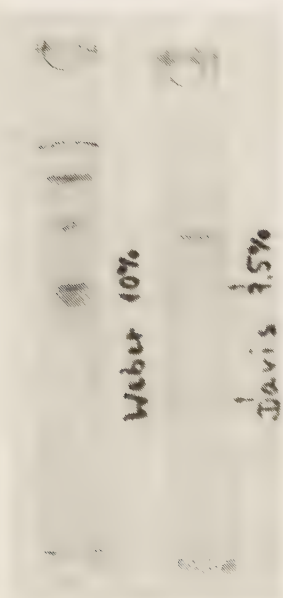


Abb. 18 Acrylamid Gelelektrophorese der Klasse I (Reinigungsstufe I) im DAVIS System (rechtes Gel) und im SDS-System (linkes Gel) (vergleiche V 5.1. und 5.3.)

Abbildung 18 zeigt Gelelektrophoresen der Ribonuklease H nach allen beschriebenen Reinigungsschritten. Im rechten 7,5 tigen Gelsystem nach DAVIS ist hauptsächlich die Enzymbande mit zwei schwachen Verunreinigungen zu erkennen, welche in der Abbildung allerdings nur schlecht hervortreten (durch einen Pfeil angedeutet).

In der SDS-Gelelektrophorese nach WEBER und OSBORN sind vier Proteinbanden in geringer und zwei in hoher Konzentration zu sehen. Aufgrund ihres Mengenanteils an der aufgetragenen Probe und des ermittelten Molekulargewichts von 85.000 für die obere und 43.000 für die untere lassen sich die beiden stark gefärbten Banden der RNase H mit ihrem Molekulargewicht von etwa 125.000 zuordnen.

7. Untersuchungen zur Enzymwirkung

7.1. Ausschluß von Fremdaktivitäten und Nachweis der Substratspezifität

Zum Nachweis der Substratspezifität der RNase H wurden geeignete Substrate in vergleichbaren Konzentrationen bei 37°C eine halbe Stunde mit einer konstanten Enzymmenge (Reinigungsstufe F) im Testansatz inkubiert.

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. (siehe nächste Seite)

<u>Substrate</u>	<u>% säurelösliche Radioaktivität</u>
^3H -E.Coli DNA, nativ	0
^3H -E.Coli DNA, denaturiert	0
^3H -M 12 Virus RNA, doppelsträngig	0
DNA- ^3H -RNA Hybrid	70
DNA- ^3H -RNA Hybrid, denaturiert	0
poly dA:poly ^3H -rU Hybrid	0
poly dT:poly ^3H -rA Hybrid	73
poly dG:poly ^3H -rC Hybrid	0
poly dC:poly ^3H -rI Hybrid	84

Wie die Tabelle zeigt, sind in der Enzympräparation nach der DE-52 Chromatographie keine DNasen, RNasen oder Phosphodiesterasen als Kontamination enthalten. Das beweist, daß durch die Reinigung eine vollständige Abtrennung dieser Fremdaktivitäten gelungen ist.

Gleichzeitig lassen sich aus den Versuchen Aussagen über die Spezifität des Enzyms ableiten. Ribonuklease H spaltet ausschließlich Polyribonukleinsäuren, welche im Komplex mit den entsprechenden Polydesoxyribonukleinsäuren vorliegen. Dabei zeigt sich bei den Homopolymeren eine deutliche Präferenz für die Purinbasen A und I. Die Spezifität gegenüber Guanosin wird in einem späteren Experiment ebenfalls nachgewiesen werden (vergleiche II. 7.4.)

7.2. Endonukleolytischer Spaltungsmechanismus

Die Art der Spaltung ließ sich durch Untersuchung der Reaktionsprodukte des enzymatischen Hybrids nach verschiedenen Inkubationszeiten klären. Bei typischer

exonukleolytischer Katalyse werden während des Reaktionsablaufs nur zwei Produkte gebildet, die fortwährend kürzer werdende Rumpf-RNA und ein steigender Betrag an Mononukleotiden. Durch endonukleolytische Katalyse wird schon nach kurzen Inkubationszeiten die gesamte RNA in kürzere Bruchstücke gespalten, welche dann später ebenfalls bis zu Mononukleotiden gespalten werden können.

Für diese Untersuchung schien eine Chromatographie der Produkte nach Molekülgröße auf Sephadex G-100 am besten geeignet, da die durch Erhitzen aus dem Hybrid freigesetzte RNA zu 95 % im Ausschlußvolumen eluiert, und sich so eine geringfügige Veränderung der Molekülgröße leicht feststellen läßt.

Es wurde das Puffersystem von STANLEY (37) gewählt, um Einflüsse von Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren bei der Chromatographie auszuschalten.

Aliquote wurden dem Standardansatz nach verschiedenen Zeiten entnommen, 10 Minuten bei 95°C gehalten und schnell in Eiswasser abgekühlt, um die Reaktion zu beenden und die RNA aus dem Hybrid zu befreien. Die Proben wurden mit Harnstoff und Ammoniumkarbonat bis zur gewünschten Konzentration versetzt und in der beschriebenen Säule nach Molekülgröße aufgetrennt. In den einzelnen Fraktionen wurde die Radioaktivität nach Zusatz von 3 ml Wasser und 20 ml Brays (38) Lösung im Scintillationszähler bestimmt. Abbildung 19 zeigt einen endonukleolytischen Spaltungsmechanismus an, da durch die Enzymwirkung die hybridisierte RNA successiv zu kleineren Bruchstücken hydrolysiert wird. Eine typische Exonuklease würde während der ganzen Reaktionszeit ausschließlich Mononukleotide abspalten.

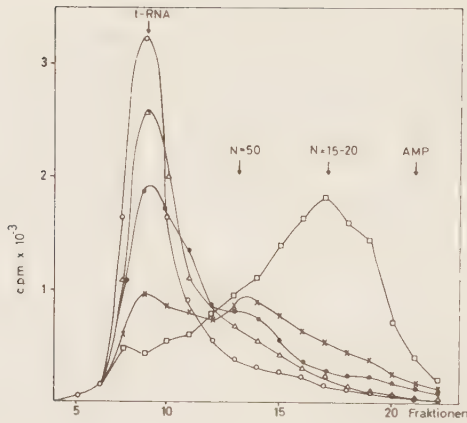


Abb. 19 Endonukleolytische Spaltung des Hybrids
Chromatographie der Reaktionsprodukte nach ver-
schiedenem Inkubationszeiten in einer Sephadex
G-100 Säule

○ — ○ Kontrolle (Hybrid ohne Enzymeinwirkung)
Inkubation des Hybrids mit RNase H für
3 Min ▲ — ▲ , 8 Min ● — ● ,
15 Min × — × , 60 Min □ — □ .

7.3. Kettenlänge der Endprodukte nach enzymatischer Hydrolyse

Zur Untersuchung, bis zu welcher Kettenlänge Ribonuklease H hybridisierte RNA spaltet, wurden die Produkte nach erschöpfender Hydrolyse des Hybrids mit einem Überschuß an Enzym in einer Sephadex G-25 fine Säule chromatographiert. Diese war nach den Angaben von STANLEY (37) vorbereitet, vor Gebrauch bis zur Volumenkonstanz gewaschen und geeicht (siehe exp. Teil).

Abbildung 20 zeigt, daß die gesamte hybridisierte RNA zu Bruchstücken kleiner als $N = 14$ hydrolysiert ist. Interessant ist das Auftauchen von zwei Oligonukleotidpeaks, der eine bei $N = 6-14$, der andere bei $N = 2$. Das Auftreten von

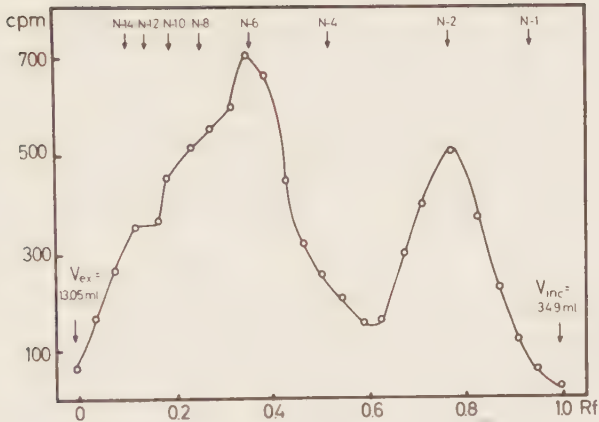


Abb. 20 Kettenlängenbestimmung der Endprodukte der enzymatischen Reaktion. Die Produkte der Enzymreaktion wurden, wie in V. 6. beschrieben, in einer geeichten Sephadex G-25 feine Säule nach Molekülgröße aufgetrennt.

Hexa- und größeren Nukleotiden ist verständlich, da Oligonukleotide um $N = 10$ schon nicht mehr als stabiles Hybrid vorliegen und so dem Enzymangriff nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Bildung des Dinukleotidpeaks ließe sich aus einer Anhäufung von stärker bindenden Purinbasen in der RNA z.B. Adenosin erklären, die damit dem Enzymangriff länger als Substrat zur Verfügung stehen.

Diese Interpretation würde mit den Daten von STEIN (39) übereinstimmen, welcher bei der Kettenlängenbestimmung der Endprodukte einer enzymatischen Hydrolyse von Ribohomopolymerhybriden folgendes Ergebnis erhielt: Bei der Spaltung eines poly A:polydT Hybrids fand er eine durchschnittliche Kettenlänge von $N \approx 4$, für poly U : poly dT ergab sich ein Wert von $N \approx 8$.

7.4. Spaltung der 3'-Phosphodiesterbindung und Basenspezifität

Bei den Untersuchungen zur Basenspezifität in den Homopolymerhybriden (vergleiche II. 7.1.) hatte Ribonuklease H schon eine deutliche Präferenz für die Purinnukleoside Inosin und Adenosin gezeigt.

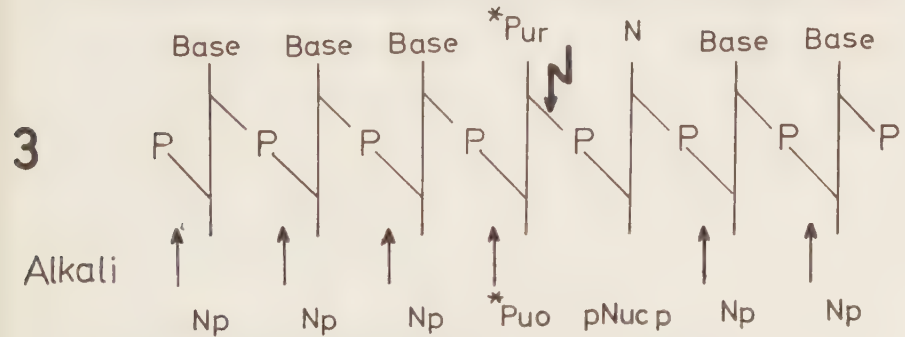
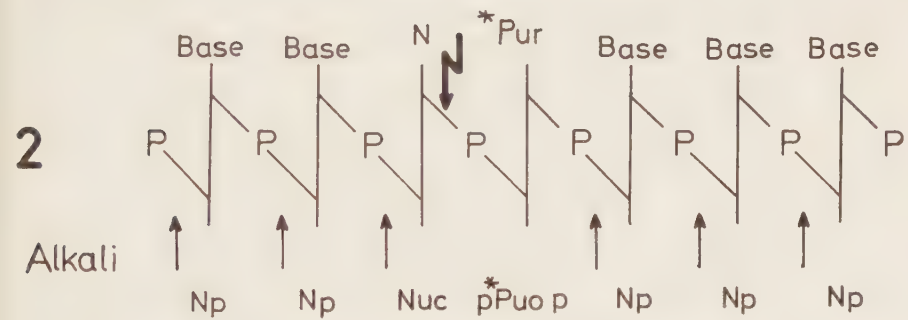
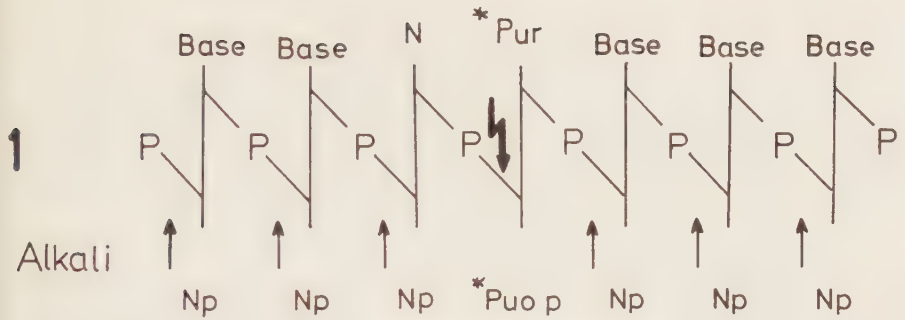
Da man argumentieren könnte, daß sich z.B. poly dA : poly rU aufgrund seiner Instabilität in das Tripelhybrid dA : rU₂ umlagert (40) und so eventuell vom Enzym nicht mehr gespalten werden kann, erschien es vorteilhaft, die Spezifität gegenüber Purinbasen bei Guanosin in einem natürlichen Hybrid mit allen 4 Basen zu zeigen.

Mit der folgenden Versuchsanordnung läßt sich nicht nur diese Frage klären, sondern auch, ob das Enzym die 3'- oder 5'-Phosphatbindung spaltet.

Aus den 4 Nukleosidtriphosphaten, ¹⁴C-GTP, ³H-UTP und einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA wurde mit E.coli RNA-Polymerase ein radioaktives Hybrid synthetisiert.

Nach weitgehender Hydrolyse durch Ribonuklease H und anschließender alkalischer Totalhydrolyse wurde eine Chromatographie der Produkte auf PEI-Zellulose Ionenaustauscherfolien durchgeführt.

Es sollte bei enzymatischer Spaltung der 5'-Phosphatbindung keine Veränderung gegenüber einer Kontrolle auftreten (vergleiche Schema 1), während bei Lösung einer 3'-Phosphatbindung Nukleosiddiphosphate oder Nukleoside entstehen. Das heißt, wenn das Enzym die 3'-Phosphodiesterbindung in Nachbarschaft zu einem Purin in Richtung zum 5'-Phosphat Kettenende hydrolysiert, treten nach alkalischer Hydrolyse



Pur = Purinbase

Puo = Ribosid eines Purins

N = benachbarte durch die Spaltung freigesetzte Base

Nuc = unspezifisches Nukleosid

radioaktive Purinnukleosiddiphosphate in großer Zahl auf (vergleiche Schema 2), während bei Spaltung der 3'-Phosphatbindung in Richtung des 3'-OH Kettenendes Nukleoside vermehrt gebildet werden (vergleiche Schema 3).

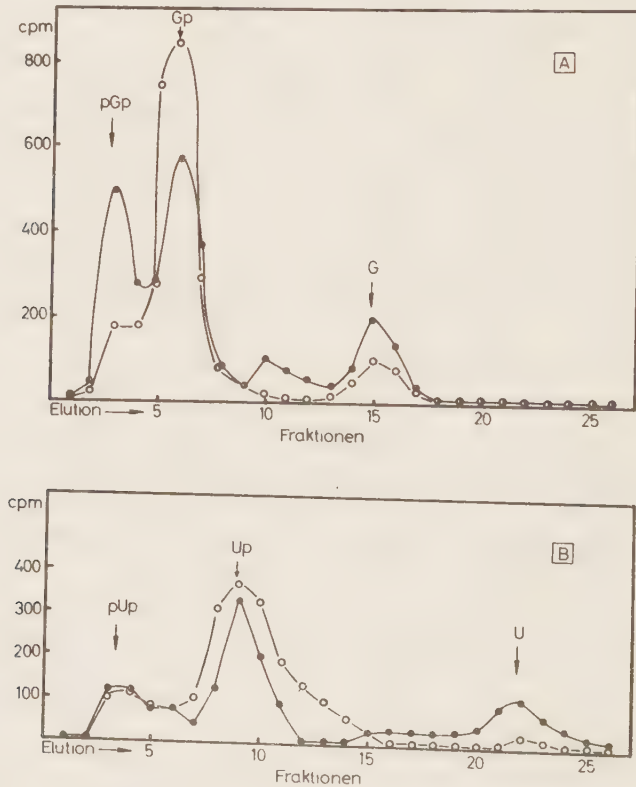


Abb. 21 Dünnschichtchromatographie der enzymatischen Spaltungsprodukte eines RNA Hybrids nach alkalischer Totalhydrolyse. Das Hybrid war mit ^{14}C -GTP und ^3H -UTP radioaktiv markiert. Es wurde mit RNase H inkubiert, die entstandenen Oligonukleotide wurden anschließend durch Alkali hydrolysiert. Die Chromatographie der Produkte erfolgte auf PEI-Zelluloseaustauscherfolien mit einer 0,35 M LiCl-Lösung.

○ — ○ Radioaktivitätsverteilung der Alkali-
produkte eines nicht mit RNase H inkubierten Hybrids

● — ● Radioaktivitätsverteilung der Alkaliprodukte nach vorheriger RNase H-Einwirkung (vergleiche V. 7.1. und 7.2.)

Ein nur schwaches Ansteigen von radioaktiven Purinnukleosiddiphosphaten bzw.-nukleosiden ergibt sich als statistische Folge, wenn der Nachbar N mit der Wahrscheinlichkeit 1:4 ebenfalls radioaktiv markiert ist.

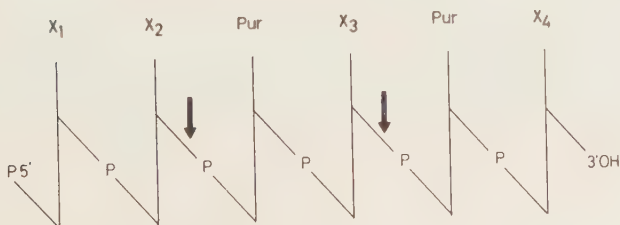
Abbildung 21 A zeigt den Verlauf der ^{14}C Guanosin -,
Abbildung 21 B den der ^3H Uracil Radioaktivität nach
Enzymbehandlung, alkalischer Hydrolyse und anschließender
Chromatographie auf PEI-Zellulose Folien.

Die Interpretation der Chromatogramme ist folgende.

1. Das Enzym spaltet eine 3'-Phosphodiesterbindung, da Nukleosiddiphosphate gebildet werden.
2. Es spaltet spezifisch neben Purinen, da nur in der Guanosinmarkierung eine starke Vermehrung von Reaktionsprodukten gegenüber der Kontrolle zu beobachten ist (und da, wie schon erwähnt, nur die Purinhomopolymeren hydrolysiert werden). Es ist keine der Uridindiesterbindingen gespalten, während etwa 50 % der Guanosinbindungen hydrolysiert sind.
3. Ribonuklease H spaltet in Nachbarschaft zu einem Purin die 3'-Phosphodiesterbindung in Richtung zum 5'-Phosphatkettenende, weil nach alkalischer Hydrolyse Nukleosiddiphosphate und nicht Nukleoside in großer Zahl auftreten.

Aus den genannten Gründen ergibt sich für die Hybrid-Nuklease folgende Spaltungsstelle.

Spaltungsstelle der RNase H



III DISCUSSION

Zu Beginn dieser Arbeit lag die Entdeckung und Untersuchung der RNase H aus dem Kalbsthymus von STEIN und HAUSEN (1,2) vor. Die Verfasser reicherten das Enzym aus dem Gesamtgewebe durch Säurepräzipitation bei pH 5,25, fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und DE-Sellulose-chromatographie an.

In der Rattenleber fand sich das Enzym hauptsächlich im löslichen cytoplasmatischen Überstand, so daß dieser auch als Ausgangsmaterial für die Isolierung verwendet wurde. Eine Säurefällung, wie von STEIN und HAUSEN beschrieben, brachte keine Anreicherung, dafür konnte die Ammoniumsulfatfällung und DE-32 Chromatographie mit leichten Änderungen übernommen werden. Es wurde anschließend eine Sephadex G-100 Gelfiltration versucht, welche aber nicht befriedigend verlief, da das Enzym im Bereich des Ausschlußvolumens eluierte und so nicht mehr von größeren Molekülen abgetrennt wurde. Nach der Umstellung auf Sephadex G-200 und Chromatographie unter Zusatz von 0,4 M NH_4Cl zur Verhinderung von Proteinagregaten ließ sich eine gute Reinigung erzielen. Bis zu diesem Anreicherungs-schritt zeigte die RNase H-Präparation immer DNase und RNase Fremdkativitäten, welche sich schon im Sephadex G-200 Elutionsprofil als eine etwas zu größeren Molekulargewichten verschobene Aktivität nachweisen ließ.

In einer Reihe von Versuchen wurde mit der G-200 Fraktion nach weiteren geeigneten Nachschubschritten gearbeitet, wobei folgende Ergebnisse erzielt wurden: In native Gelelektrophorese im DAVIS Gelsystem (im Eluat konnte keine Aktivität nachgewiesen werden). DE-Sellulose Chromatographie bei

pH 4,8, pH 5,9 und pH 6,5, DNA-Agarose Affinitätschromatographie (Protein- und Aktivitätsverlauf waren nahezu identisch, so daß kein Reinigungseffekt erreicht wurde). In der isoelektrischen Fokussierung, Phosphozellulose- und Hydroxyapatitchromatographie wurden zwar sehr viele Fremdproteine abgetrennt, aber die Enzymaktivität ging nahezu vollständig verloren. Diese Reinigungsschritte wurden daher später nur mit einem Teil der Enzympräparation durchgeführt, um trotz hoher Aktivitätsverluste ein möglichst einheitliches Enzympräparat in die Hand zu bekommen, welches dann in die Enzymuntereinheiten gespalten werden konnte.

Für die enzymatischen Untersuchungen war es unumgänglich, das Reinigungsverfahren auf die wenigen geeigneten Schritte zu beschränken und sie so zu modifizieren, daß die Fremdnukleaseaktivität abgetrennt werden konnte. Das Ergebnis der Sephadex G-200 Gelfiltration legte nahe, daß mit einer Chromatographie bei extrem geringem Auftragsvolumen und einem Säulenmaterial mit besseren Trennleistungen in diesem Molekulargewichtsbereich, z.B. Sephadex G-150 superfine, eine Auftrennung der beiden Aktivitäten möglich sein sollte. So kam der aufwendige Präparationsgang mit mehrmaligen Rechromatographieschritten zustande, welcher eine hohe Ausbeute an Enzymaktivität unter gleichzeitiger früher Abtrennung von Fremdproteinen gewährleistet. Dadurch war es möglich, die Ausgangsmenge von ca. 50 g Protein durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, DE-32 und Sephadex G-200 Chromatographie auf etwa 150 mg zu senken. Bei einer Auftragsmenge von 1,5 % des Säulenvolumens konnte dann die Hybrid-Nuklease von der anderen nukleolytischen Aktivität auf Sephadex G-150 superfine abgetrennt werden. In einer mehrmaligen Chromatographie an DE-52, einem feinkörnigeren Material als DE-32 mit besseren Trennleistungen, konnte die Ribonuklease H mit sehr flachen großvolumigen

Salzgradienten weiter angereichert werden. Diese Fraktion wurde in allen Experimenten verwendet, da sie frei von störenden Nukleaseaktivitäten war.

Es wurde auch versucht, eine Anreicherungstabelle mit den entsprechenden Angaben zu erstellen. Dieses Vorhaben ließ sich nicht durchführen, da in dem Ausgangsmaterial mehrere andere nukleolytische Aktivitäten vorhanden sind, welche eine zu hohe Anfangsaktivität vortäuschen. Diese Schwierigkeit liegt natürlich auch in der ungenügenden Spezifität des Testsystems bzw. in der Art des angebotenen Hybrids begründet, welches nicht nur der RNase H als Substrat dienen kann. Ein DNA-RNA Hybrid wird sicherlich von verschiedenen Phosphodiesterasen, welche auch für das Rattenlebersystem beschrieben sind (41,42), und auch durch eine gemeinsame Aktion einer DNase und RNase gespalten. Normalerweise sollten RNasen allein bei geringen Konzentrationen "hybridisierte RNA" nicht hydrolysieren. Dazu ist es aber erforderlich, ein DNA-RNA Hybrid frei von nicht hybridisierter RNA herzustellen.

Unter den im exp. Teil beschriebenen Bedingungen entsteht bei der Synthese des Hybrids auch freie RNA in einzel- und doppelsträngiger Struktur. Zu ihrer möglichst vollständigen Entfernung wurden die Syntheseprodukte in einer Biogel Säule chromatographiert, so daß weitgehend hybridisierte RNA von freier abgetrennt werden konnte. An das synthetisierte und gereinigte Hybrid wurden zwei Forderungen gestellt,

1. der durch pankreatische RNase (1 µg/ml) verdaubare Anteil an nichthybridisierter RNA darf 5 % nicht übersteigen
2. in der CsCl bzw. CsSO₄ Gleichgewichtsgradientenzentrifugation sollte neben der hybridisierten RNA möglichst wenig freie nachweisbar sein.

Wegen der immensen Schwierigkeiten, die bei der Synthese von weitgehend standardisierten Hybriden mit verschiedenen RNA-Konzentrationen auftauchen, konnten keine kinetischen Messungen mit variablen Substratkonzentrationen durchgeführt werden. Außerdem ergeben sich meßtechnische Probleme, da sich die wirklichen Geschwindigkeiten der Enzymkatalyse durch die hier verwendete Methode der Messung des säurefällbaren Materials nicht bestimmen lassen. Es ist nämlich bekannt, daß Oligonukleotide mit einer Kettenlänge von etwa $N = 10$ auf Papierblättchen in Trichloressigsäure zu präzipitieren beginnen. Da auf der anderen Seite RNA bei einer Kettenlänge von $10 - 15$ Nukleotiden von der DNA abzudissoziieren beginnt, und damit nicht mehr von der RNase H gespalten werden kann, wird im Test ein großer Teil der schon degradierten RNA (mehr als 40 %, siehe unter II. 4.5.) zusammen als säurepräzipitierbares Material bestimmt. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ist daher sicherlich größer, als durch den beschriebenen Test angezeigt wird. Dieses zeigt sich schon sehr deutlich, wenn man wie in den Kinetiken (II. 4.5.) erkenntlich, die RNase H Aktivität nach verschiedenen Inkubationszeiten mit AF/O13 hemmt und dann die freien kurzen RNA-Oligonukleotidstücke mit pankreatischer RNase verdaut. Eine korrekte Messung der Geschwindigkeit ließe sich mit einem radioaktiven Hybrid in geringen Konzentrationen nur durchführen, wenn die Reaktionsprodukte jeweils über eine geeignete Säule, z.B. Sephadex G-75 chromatographiert würden, um dann im Ausschlußpeak die noch nicht verdaute hybridisierte RNA zu bestimmen. Ideal wäre natürlich die Messung von gespaltenen Phosphodiesterbindungen z.B. anhand der pH-Verschiebung des Enzymsatzes am pH-Statgerät. Nur so ließe sich der Spaltungsmechanismus der Hybrid-Nuklease aufklären, obwohl dieser Weg mit großem Aufwand bei der Präparation von Enzym und Substrat verbunden ist.

Zur Wirkungsweise des Enzyms kann folgendes gesagt werden: Da die RNase H keine freie RNA hydrolysieren kann, war es vorauszusehen, daß als Endprodukte einer endonukleolytischen Spaltung Oligonukleotide mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von $N = 10$ entstehen würden. Es ist nämlich aus früheren Untersuchungen bekannt (43), daß schon Decanukleotide nicht mehr als stabiler Komplex vorliegen und vom DNA-Strang abzudissoziieren beginnen. Daher wäre im nächsten Schritt zu zeigen, ob die Hybrid-Nuklease die Oligonukleotide weiter spalten kann, wenn sie zum Beispiel durch Methylenbrücken an der DNA fixiert sind. Hinsichtlich der Endprodukte läßt sich daher noch kein Vergleich zu anderen Nukleasen ziehen.

Die Substratspezifität ist eindeutig und von allen bisher bekannten Enzymen abgrenzbar. In E.Coli wurde zwar ein ähnliches Enzym (Exonuklease III) nachgewiesen (44), welches ebenfalls hybridisierte RNA hydrolysiert, aber es unterscheidet nicht, ob die RNA mit RNA oder mit DNA komplexiert ist. Die Hybrid-Nuklease degradiert dagegen ausschließlich RNA, welche mit DNA hybridisiert ist.

Auffallend im Vergleich zu anderen bisher beschriebenen Nukleasen ist das hohe Molekulargewicht, welches sich aber gut in das Bild einer sehr spezifischen Nuklease einfügen läßt. Bemerkenswert ist ebenfalls die starke Hemmung der Enzymreaktion durch geringe Konzentrationen des Rifamycin-derivats AF/013. Dieser Inhibitor wurde ursprünglich zur Hemmung und Untersuchung verschiedener RNA-Polymerasen verwendet. Da er im Gegensatz zu Actinomycin D am Enzymprotein angreift, lassen sich vielleicht verwandte Strukturen ableiten. Dieses wird umsomehr bestätigt, weil keine der bekannten Nukleasen, wie pankreatische RNase, DNase I und II, Phosphodiesterase I und II, T_1 RNase durch AF/013 gehemmt werden (45).

Alle anderen ermittelten Eigenschaften, wie die Spaltungsstelle, das pH-Optimum und die Metallionenabhängigkeit passen sehr gut in das allgemeine Einteilungsschema für Phosphodiesterasen. Aufgrund der pH-Abhängigkeit lassen sich zwei Gruppen bilden, von denen die eine Mg^{2+} als Aktivator benötigt und die Katalyse im alkalischen Bereich durchführt (46,47), während die andere im Sauren arbeitet und die Spaltung ohne Cofaktoren vornimmt (48,49).

Wie schon in der Einleitung für die RNA-Virusvermehrung gezeigt werden konnte, scheint die biologische Funktion der Hybrid-Nuklease bei den Prokaryonten im Bereich der DNA-Vermehrung zu liegen.

Neuere Arbeiten deuten darauf hin, daß DNA-RNA Hybride in Form von kurzen RNA-Primermolekülen unerlässlich für die DNA-Replikation zu sein scheinen (33,50,51). Es konnte nämlich gezeigt werden, daß in vitro an f_d -DNA (native einzelsträngige Phagen DNA) die Synthese des komplementären Stranges nicht ohne "RNA Primer" stattfinden kann.

Synthetisiert man daher vorher mit RNA-Polymerase ein kurzes RNA-Hybridstück, so kann anschließend die Synthese der komplementären DNA erfolgen (ungekuppeltes System). Ebenso findet die DNA-Replikation statt, wenn DNA- und RNA- Synthese gleichzeitig ablaufen (gekuppeltes System) (52). Die resultierenden kovalent verbundenen DNA-RNA Moleküle konnten auch in vivo in E.Coli (25) nachgewiesen werden. Für die Entfernung dieser hybridisierten RNA könnte dann wiederum die Hybrid-Nuklease verantwortlich sein.

Ob dieser Mechanismus auch für die Vermehrung der eukaryotischen DNA von Bedeutung ist, bleibt abzuwarten,

da 1. die Zellvermehrung nur in einem kurzen Zeitintervall stattfindet 2. während des Zellzyklus keine Veränderung des RNase H Titors zu beobachten ist und 3. die Anwesenheit der Hybrid-Nuklease im Cytoplasma in doch sehr hohen Konzentrationen in diesem Zusammenhang nur schwer zu interpretieren ist.

Andererseits spricht gerade der letztgenannte Grund für eine biologische Funktion der Hybrid-Nuklease bei der Abwehr von DNA-Virus Infektionen. Wenn für die Replikation der Virus-DNA tatsächlich zunächst die Synthese eines RNA-Primers in Form eines Hybrids notwendig sein sollte, könnte die RNase H schon im frühen Stadium die Virusinfektion stoppen, indem sie die Primer-RNA hydrolysiert und damit die Vermehrung des Virus hemmt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es noch zu früh ist, Aussagen über die tatsächliche biologische Rolle dieses interessanten Enzyms zu machen. Da es aber nunmehr möglich ist, gereinigte Hybrid-Nuklease ohne störende Fremdaktivitäten zu präparieren, sollten sich die ange-deuteten Hypothesen in der nächsten Zeit überprüfen lassen.

IV ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Hybrid-Nuklease, welche den RNA-Anteil eines DNA-RNA Hybrids spezifisch spaltet, wurde aus dem Rattenlebercytoplasma durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation, DE-32 und DE-52 Zellulosechromatographie, Sephadex G-200 und Sephadex G-150 superfine Gelfiltration, isoelektrische Fokussierung, Phosphozellulose und Hydroxyapatitchromatographie weitgehend gereinigt.

2. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von 120 - 125.000 Dalton und besteht wahrscheinlich aus zwei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 85.000 und 43.000.

3. Die Enzymkatalyse verläuft am schnellsten bei pH 7,9 und ist von der Zufuhr bivalenter Kationen abhängig, wobei Mg^{2+} die Reaktion stärker aktiviert als Mn^{2+} . Durch Zusatz eines 500-fachen Überschusses von DNA oder t-RNA wird die Reaktion nicht beeinflusst. p-Chlormercuribenzoat und AF/013 bewirken eine vollständige Hemmung des Enzyms.

4. Gereinigte RNase H hydrolysiert weder native oder denaturierte DNA, noch einzel- oder doppelsträngige natürliche bzw. synthetische Ribopolynukleotide. Synthetische Homopolymerhybride werden nur hydrolysiert, wenn ihr RNA-Anteil aus Purinbasen zusammengesetzt ist.

5. Das Enzym spaltet die RNA in einem endonukleolytischen Mechanismus, so daß sich Oligonukleotide als Endprodukte der Reaktion ergeben. Sie bestehen meist aus 6 - 14 Nukleotiden und besitzen eine 5'-Phosphat-Endgruppe. Das Enzym hydrolysiert demnach die 3'-Phosphodiesterbindung neben einer Purinbase in Richtung zum 5'-Phosphat-Kettenende.

V BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. Material und allgemeine Arbeitsmethoden

1.1. Verwendete Substanzen, Puffer und Enzyme

Substanzen:

120 - 180 g schwere männliche Wistar BR II Ratten der Firma Brünge wurden verwendet.

Ribonukleosidtriphosphate und Homodesoxyribopolymere wurden von der Firma Boehringer in Mannheim geliefert.

^3H -markiertes Uridintriphosphat (5 m Ci/o,11 mg) und Guanosintriphosphat (38 m Ci/mMol) wurde von New England Nuclear Corporation, ^3H -markierte Homoribopolymere von Schwarz/Mann bezogen. Bio-rad in München lieferte Biogel A-1,5 m, Pharmacia, Uppsala die Sephadex Produkte und Whatman, Heidelberg die Zelluloseionenaustauscher.

Hydroxyapatit wurde nach der Vorschrift von LEVIN (53) präpariert.

PH-Cellulosefolien lieferte die Firma Schleicher & Schüll. Prof. Hofschneider, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, stellte freundlicherweise doppelsträngige ^3H -M 12 Phagen RNA (20000 cpm/ μg) und Dr. Radzak, Hygiene-Institut, Marburg, ^3H -E.Coli DNA (4000 cpm/ μg) zur Verfügung. Alle anderen verwendeten Reagenzien waren analytisch rein.

Puffer

Für alle Präparationen und Untersuchungen wurden folgende Puffer verwendet:

ISS: 250 mM Sucrose, 25 mM KCl, 10 mM MgCl_2
50 mM Tris-GCl pH - 7,55

Puffer A: 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,25 mM EDTA,
1 mM $MgCl_2$, 10 mM Mercaptoäthanol

Hybridpuffer: 30 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,3 M NaCl

Enzyme:

Pankreatische Ribonuklease (E.C. 3.1.4.22) wurde von Merck geliefert (20 E/mg)

RNA-Polymerase (E.C. 2.7.7.6) wurde aus E.-Coli Zellen, wie von Zillig et al. (54) beschrieben, isoliert.

1.2. Allgemeine Bestimmungsmethoden

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von LOWRY et al. (55) mit Serumalbumin (von Merck) als Standard. Desoxyribonukleinsäure wurde nach BURTON (56) bestimmt, jeweils zusammen mit einer durch UV-Messung quantitierten reinen Leber-DNA-Lösung zum Vergleich. Die spektral-photometrischen Bestimmungen wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer durchgeführt.

Die RNA-Bestimmungen erfolgten nach der Orcin-Methode von OGUR und ROSEN (57). Die Cl^- -Konzentration in den Säuleneluatn wurde über eine Titration nach MOHP (58) ermittelt. Zur Bestimmung von nukleinsäuregebundener Radioaktivität wurden aliquote Proben auf Filterpapier (SS 2043 b) ausgestrichen und in 5 % (w/v) TCA ausgefällt, wie es bei SEKERIS et al. (59) beschrieben ist.

Die Scintillationsflüssigkeiten waren wie folgt zusammengesetzt:

"T-Fluor": 5 g PPO (2,5-Diphenyloxazol), 200 mg POPOP
1,4-Di-2(5-phenyloxazolyl)benzol in 1 l Toluol

"Bray's Lösung": 60 g Naphtalin, 4 g PPO, 200 mg POPOP,
100 ml Methanol, 20 ml Äthylenglykol, 880 ml Dioxan.

Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Nuclear Chicago Mark I Scintillationszähler bestimmt.

1.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit radioaktivem Substrat

Die Enzymaktivität wird als Verminderung der säure-
präzipitierbaren RNA eines DNA-³H- RNA Hybrids gegenüber
einer nicht enzymbehandelten Kontrolle ausgedrückt.
Es werden Enzym, Puffer A, MgSO₄ und NaCl in den in
der Tabelle angegebenen Mengen zusammenpipettiert
und auf 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wird durch
Zugabe von ebenfalls vorgewärmten radioaktivem Hybrid
gestartet. In den Kontrollansätzen wird die Enzym-
menge durch Puffer A ersetzt. Alle Bestimmungen werden
in Triplikaten ausgeführt.

	Volumen Konz.	Endkonz.	Menge/Ansatz
³ H-radioaktives Hybrid	10 µl 3,3x10 ⁻⁵ M	2.2x10 ⁻⁶ M	0,1 µg
MgCl ₂	10 µl 9x10 ⁻² M	6x10 ⁻³ M	9x10 ⁻⁷ Mol
NaCl	10 µl 1.5 M	0,1 M	1,5x10 ⁻⁵ Mol
Puffer A	20 µl 10 ⁻² M	-	-
Enzym in Puffer A	100 µl		0,5-1 µg

Nach 15 - 60 Minuten, entsprechend 20 - 50 % Degradation
des Hybrids, werden 130 µl des Inkubationsansatzes auf
5 x 5 cm große Schleicher & Schüll 2043 b Papierblättchen
gleichmäßig ausgestrichen und in 5 %iger TCA (w/v)
ausgewaschen. Die Enzymreaktion wird dadurch gestoppt,
und gleichzeitig wird nicht verdautes Hybrid auf dem
Filterpapier präzipitiert, während kurze Abbauprodukte
in Lösung gehen. Nach zweimaligem weiteren Auswaschen
der säurelöslichen Nukleotide wird die TCA durch
Äthanol- und anschließend durch Ätherbehandlung entfernt.
Die Papierblättchen werden an der Luft getrocknet, und
die auf ihnen präzipitierte Radioaktivität des Hybrids
wird mit "T-Fluor" durch Scintillationsmessung bestimmt.

Die Enzymaktivität ergibt sich damit als Differenz der Zerfälle zwischen der Kontrolle und der enzymbehandelten Probe.

Als Enzymeinheit (Laborhilfs-Einheit) wird die Enzymmenge definiert, die in 10 Minuten Inkubation bei 37°C 1500 cpm hybridisierter RNA (entsprechend 0,03 µg RNA = 100 pMol Nukleotidbaustein) hydrolisiert.

2. Darstellung der Substrate

2.1. Enzymatische Synthese des DNA-RNA Hybrids

Die Polymerisation der 4 Nukleosidtriphosphate wurde mit E.-Coli RNA Polymerase (33) an einzelsträngiger Kalbsthymus-DNA durchgeführt. Diese war vorher durch zehnminütiges Erhitzen im Wasserbad bei 95°C und schnelles Abkühlen in Eiswasser von der Doppel- in die Einzelstrangstruktur überführt worden. Der Inkubationsansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

GTP, ATP, CTP (je $4 \times 10^{-3} \text{ M}$, UTP $4 \times 10^{-4} \text{ M}$)	3,0 ml
KCl (0,6 M)	1,0 ml
MnCl ₂ (0,6 M)	0,2 ml
einzelsträngige DNA (1 mg/ml)	1,0 ml
E.-Coli RNA Polymerase (600 µg)	3,0 ml
³ H UTP (250 µCi)	0,5 ml
Dithiothreitol (0,6 M)	0,2 ml
Tris-HCl-Puffer (0,067 M pH 7,9)	<u>3,1 ml</u>
	12,0 ml

Nach 6 Stunden Synthese wurde der Inkubationsansatz dreimal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt, um die Proteine zu denaturieren und durch Zentrifugation zu entfernen. Anschließend wurden alle Nukleinsäuren durch Zugabe von 3 Volumina

kalten Äthanolis ausgefällt. Nach 12-stündigem Stehen bei -20°C wurde alles gefällte Material abzentrifugiert, in 3,0 ml Hybridpuffer gelöst und 2 x 6 Stunden gegen je 1 l dieses Puffers dialysiert. Das Nukleinsäuregemisch wurde dann in einer Biogel A 1,5 m Säule (mit Hybridpuffer äquilibriert) chromatographiert. Die Ausschlußgrenze dieses Molekularsiebes beträgt 1,4 Millionen, so daß mit der hochmolekularen DNA hauptsächlich hybridisierte RNA im Ausschlußvolumen eluieren sollte.

2.2. Synthetische Homopolymerhybride

Desoxyribohomopolymere komplexieren in Salzlösungen mit Ribohomopolymeren spontan zu Hybriden. Poly dC, Poly dG und Poly dA : Poly dT Hybrid wurden als Lyophilisate erhalten. Das Hybrid wurde vor Weiterverwendung durch Zentrifugation im alkalischen CsCl-Gradienten in die Einzelpolymeren zerlegt (siehe Abb. 23).

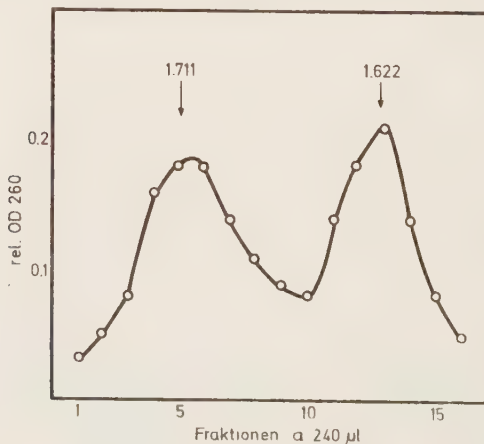


Abb. 23 Trennung eines poly dA:poly dT Hybrids in die Einzelpolymeren. Das Hybrid wurde in einer Lösung von 1,35 g CsCl/ml 0,1 N NaOH gelöst und 50 Std. in einem Beckmann SW 56 Rotor bei 40.000 UpM zentrifugiert. Die Anfangsdichte der Gradienten betrug 1,69 g/cm³.

Diese wurden dann gegen Wasser dialysiert und anschließend wieder lyophilisiert.

Die radioaktiven Ribohomopolymere Poly I, Poly C, Poly A und Poly U wurden über eine Sephadex G-75 Säule (äquilibriert mit einem Puffer, bestehend aus 30 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,2 M NaCl) chromatographiert, um bei allen 4 Polymeren kurze Ketten zu entfernen und so vergleichbare Produkte zu erhalten. Zur Quantitierung wurden sie im zuvor beschriebenen NaCl Puffer gelöst, um dann ihre optische Dichte bei den unten angegebenen Wellenlängen zu bestimmen.

Poly dA	$8,6 \times 10^{-3}$	gemessen bei	257 nm
poly dT	$8,5 \times 10^{-3}$		264 nm
Poly dC	$7,4 \times 10^{-3}$		274 nm
poly dG	$10,1 \times 10^{-3}$		252 nm
Poly rA	$9,8 \times 10^{-3}$		257 nm
Poly rU	$9,0 \times 10^{-3}$		260 nm
Poly rC	$5,2 \times 10^{-3}$		260 nm
Poly rI	$6,25 \times 10^{-3}$		260 nm

Die nun folgende Arbeitsvorschrift ist weitgehend dem Verkaufskatalog (1973) der Firma P & L entnommen.

Es wurden äquimolare Mengen der komplementären Desoxyribopolymere und Ribopolymere gemischt, wobei die oben beschriebenen molaren Extinktionskoeffizienten verwendet wurden. Nach fünfminütigem Erhitzen im Wasserbad auf 55°C und anschließendem langsamen Abkühlen, wurden die gebildeten Hybride gegen Wasser dialysiert, um den größten Teil der Salze zu entfernen.

Nachdem sie durch Lyophilisation konzentriert waren, wurden sie in einem Puffer, bestehend aus Tris-HCl 30 mM, 0,1 M NaCl, gelöst, erneut auf 55°C für 5 Minuten erhitzt und wieder langsam abgekühlt.

3. Isolierungsverfahren der RNase H

a) Rohextraktion und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (Stufe A und B)

20 Ratten werden durch Genickschlag getötet, die Lebern mit 10 ml eiskaltem TSS Puffer durchgespült und anschließend mit einer Schere zerkleinert. Das Gewebe wird nach Zusatz von 2 Volumina TSS Puffer mit einem Gerät nach Potter-Elvehjem homogenisiert, durch 2 Lagen Mull filtriert und bei 3000 UpM in einem SS-34 Rotor der Firma Sorvall 10 Minuten lang zentrifugiert. Der weitgehend von Kernen befreite Überstand wird anschließend im selben Rotor bei 20.000 UpM 1 Stunde zentrifugiert, um Lysosomen, Mitochondrien und den Hauptteil der Polysomen zu entfernen. Die Ribosomen werden in einer anschließenden Ultrazentrifugation im 50 Ti Beckmann Festwinkelrotor bei 105.000 g in 1,5 Stunden sedimentiert. Das so gewonnene klare Cytosol von 10 Aufarbeitungen wird gesammelt und bei -80°C bis zur Weiterverwendung eingefroren.

Dieser cytoplasmatische Rohextrakt (Stufe A) wird nach dem Auftauen mit TSS Puffer auf 4 l aufgefüllt, unter fortwährendem Rühren successiv mit 840 g festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt und eine weitere Stunde bis zur vollständigen Präzipitation der Proteine gerührt. Der gebildete Niederschlag wird im 19 Beckmann Festwinkelrotor in 30 Minuten bei 18.000 UpM abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Dekantieren wird der Überstand unter Rühren mit weiteren 420 g festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Im Niederschlag befindet sich die RNase H. Er wird unter ständigem Rühren in 300 ml Puffer A gelöst und gegebenenfalls durch Zentrifugation von unlöslichen Rückständen befreit.

Anschließend wird durch eine zweistündige Dialyse gegen Puffer A die Hauptmenge an Ammoniumsulfat entfernt, dann wird die Proteinlösung durch Gelfiltration über Sephadex G-25 vollständig entsalzt (Stufe B).

- b) Reinigung des Enzyms bis zur Abtrennung von Fremdaktivitäten (Stufe C-F)

Die Enzymlösung wird durch Anionenaustauschchromatographie an DE-32 von einem großen Teil der Begleitproteine befreit.

Daten: Säulenvolumen ca. 500 ml, 6 x 18 cm
DE-Zellulose nach der Vorschrift des Herstellers
vorbereitet, äquilibriert mit Puffer A
Gradient: 2 x 2 l, 0-0,2 M NH_4Cl in Puffer A
Elutionsgeschwindigkeit: 150 ml/h
Elutionsdauer: 26 Stunden
Fraktionsgröße: 30 ml

Die aktivsten Fraktionen (siehe II. 3.) werden gesammelt, die Seitenfraktionen werden unter den gleichen Bedingungen in kleineren Säulen rechromatographiert. Die vereinigten Aktivitäten der DE-Chromatographie (720 ml, Stufe C) werden mit 255 g festem Ammoniumsulfat gefällt und in 60 ml Puffer A, welcher 0,4 M an NH_4Cl ist, gelöst.

Diese Lösung wird durch zweimalige Gelfiltration an Sephadex G-200 nach Molekülgröße aufgetrennt.

Daten: Säulenvolumen 1,5 l, 4 x 125 cm
Sephadex G-200 nach den Vorschriften des Herstellers
vorbereitet und in die Säule gefüllt
Elutionsmittel: Puffer A + 0,4 M NH_4Cl
Elutionsgeschwindigkeit: 20 ml/h
Arbeitsdruck: 15 cm
Fraktionsgröße: 15 ml

Die Fraktionen 54 - 59 der 1. Gelfiltration und der Aktivitätspeak der Rechromatographie werden gesammelt (170 ml, Stufe D) und in einer Diaflo-Ultrafiltrationszelle eingengt.

Daten: 170 ml mit RNase H Aktivität
Ultrafiltrationszelle: Amicon 402
Filter PM 30
Druck: 3,5 Atm. N₂

Die Konzentrierung wird abgebrochen, wenn nur noch 12 ml Proteinlösung in der Zelle sind.

Das Enzym wird dann durch Chromatographie an Sephadex G-150 superfine von weiteren Begleitproteinen und insbesondere von einer interferierenden weiteren Nuklease (nicht näher untersucht) befreit.

Daten: Säulenvolumen: 850 ml 2,5 x 180 cm
Sephadex G-150 superfine nach den Vorschriften des Herstellers vorbereitet und in die Säule gefüllt
Elutionsmittel: Puffer A + 0,4 M NH₄Cl
Elutionsgeschwindigkeit: 5 ml/h
Arbeitsdruck: 10 cm
Fraktionsgröße: 10 ml

Die Fraktionen 34 - 40 werden gesammelt (80 ml, Stufe E) und zweimal gegen 10 Volumina Puffer A dialysiert. Die Enzymlösung wird anschließend durch dreimalige Rechromatographie an DE-52 von weiteren Begleitproteinen befreit.

Daten: Säulenvolumen: 10-15 ml, 1,8 x 7 cm
DE-52 Zellulose wie oben vorbereitet
Gradient: 2 x 200 ml, 0-0,2 M NH₄Cl in Puffer A
Elutionsgeschwindigkeit: 15 ml/h
Elutionsdauer: 26 Stunden
Fraktionsgröße: 6,6 ml

c) Weitere Reinigung zur Ermittlung der Enzym-
untereinheiten (Stufe G-I)

Die drei vereinigten Enzympeaks (Reinigungsstufe F
70 ml mit etwa 2000 E/ml), werden für Untersuchungen
zur Eigenschaft und Spezifität verwendet.

Etwa 3 mg Protein der Reinigungsstufe F werden in der
isoelektrischen Fokussierungsanlage der Firma LKB weiter
aufgetrennt (siehe genaue Versuchsbeschreibung in V. 8.).
Die Enzymaktivität der Fraktionen 20 - 25 werden vereinigt
18 ml (Stufe G), gegen 100 Volumina Puffer A dialysiert
und an einer Phosphozellulosesäule chromatographiert.

Daten: Säulenvolumen: 30 ml, 2 x 6 cm

Phosphozellulose nach der Vorschrift des Herstellers
vorbereitet, äquilibriert mit Puffer A

Gradient: 2 x 300 ml, 0-0,5 M NH_4Cl in Puffer A

Elutionsgeschwindigkeit: 20 ml/h

Elutionsdauer: 30 Stunden

Fraktionsgröße: 10 ml

Die Fraktionen 23 - 38 werden vereinigt (160 ml Stufe H),
gegen 100 Volumina 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,8 dia-
lysiert und dann mit hydrostatischem Druck mit 10 ml/h
auf eine Hydroxyapatitsäule aufgetragen.

Daten: Säulenvolumen: 5 ml, 1,2 x 7 cm

Hydroxyapatit nach LEVIN (53) präpariert und
äquilibriert mit 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,8

Gradient: 2 x 80 ml, 0-0,3 M Na-Phosphatpuffer

Elutionsgeschwindigkeit: 8 ml/h

Elutionsdauer: 20 Stunden

Fraktionsgröße: 2 ml

Die aktiven Fraktionen 33 - 45 werden gepoolt (26 ml
Stufe I) und in einer 30 %igen Polyäthylenglykollösung
(in Puffer A) unter Rühren konzentriert. Dieses Konzen-
trat wurde dann im Abschnitt II. 5. zur Ermittlung der
Enzymuntereinheiten verwendet.

4. Molekulargewichtsbestimmung der RNase H

4.1. Sucrosegradientenzentrifugation

Zentrifugiert man Proteine verschiedenen Molekulargewichts in einem Sucrosegradienten, so ergibt sich nach MARTIN und AMES (60) für die Wanderungsstrecken und Sedimentationskonstanten folgende Beziehung

$$\frac{\text{Wanderungsstrecke (unbekannt)}}{\text{Wanderungsstrecke (bekannt)}} = \frac{S \text{ (unbekannt)}}{S \text{ (bekannt)}}$$

$$S = c \times \lg M$$

Durch Bestimmung der Wanderungsstrecke läßt sich damit leicht die Sedimentationskonstante eines unbekannten Proteins bestimmen. Da aber die Sedimentationszahl und das Molekulargewicht eines Proteins in einer logarithmischen Abhängigkeit zueinander stehen, kann das Molekulargewicht bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Eichsubstanzen direkt auf halblogarithmischem Papier abgelesen werden.

Mit einem Gradientenmischer wurden 0 - 20 %ige (w/v) lineare Sucrosegradienten mit 11,0 ml Volumen in Tris-HCl pH 7,9 Puffer hergestellt. Es wurden 700 µl einer Mischung aus Katalase (MG 240.000), Aldolase (MG 147.000), Hämoglobin (MG 67.000) und 200 E Ribonuklease H auf einen Gradienten geschichtet. Drei Gradienten wurden bei 37.000 UpM 17 Stunden im SW 41 Beckmann Rotor zentrifugiert. Anschließend wurden sie mit einer Kanüle am Boden angestochen und durch Austropfen fraktioniert (8 Tropfen pro Fraktion). 2 x 50 µl jeder Fraktion wurden zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität entnommen, aus dem Rest wurde nach Verdünnen mit 2 ml Wasser im Zeiss Spektralphotometer die optische Dichte bei 280 nm bestimmt.

4.2. Sephadex G-200 Chromatographie

Das Molekulargewicht des Enzyms wurde außerdem durch Gelfiltration mit Sephadex G-200 bestimmt. Bei dieser Methode unterliegt das Protein einer definierten Verteilung zwischen den Phasen "Gel-Innenraum" und "äußeres Volumen". Der Verteilungskoeffizient K_d ist dabei eine logarithmische Funktion der Molekülgröße, in erster Näherung des Molekulargewichtes.

Chromatographiert man Proteine in Sephadex-Dextrangelen, so ergibt sich für die Elutionsvolumina V_e folgende Abhängigkeit

$$V_e = V_o + K_d \times V_b \qquad K_d = c \times \lg M$$

Das Ausschlußvolumen V_o und das Innenvolumen V_c sind Konstanten einer Säule. Bestimmt man daher die Elutionsvolumina mehrerer Proteine und trägt diese als Funktion gegen $\lg M$ in einem Eichdiagramm ab, so kann das Molekulargewicht einer unbekannten Probe sofort anhand des Elutionsvolumens aus der Eichkurve abgelesen werden.

Es wurden 500 E Ribonuklease H zusammen mit Katalase, Aldolase und Hämoglobin in 2 ml Puffer A in einer 220 ml Sephadex G-200 Säule (1,6 x 110 cm) chromatographiert. Die Fraktionsgröße betrug 3,3 ml bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/h. 100 μ l jeder Fraktion wurden zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität, der Rest zur Bestimmung der optischen Dichte bei 280 nm verwendet.

5. Ermittlung der Enzymuntereinheiten

5.1. Davis Acrylamid Gelelektrophorese

Acrylamid polymerisiert unter Katalyse von Ammoniumperoxodisulfat bzw. von Riboflavin und Licht bei Zusatz von N,N-Methylenbisacrylamid zu einem stark vernetzten

Gel. Die Porengröße ist abhängig von der Konzentration und von dem Mischungsverhältnis beider Komponenten. In dem hier verwendeten diskontinuierlichen 7,5 %igen Gelsystem, beschrieben von DAVIS et al. (36), ist die durchschnittliche Porenweite so bemessen, daß sie den Eintritt von Proteinen bis zu einem Molekulargewicht von ca. 150.000 Dalton erlaubt."

Etwa 15 - 50 µg der jeweiligen Enzymfraktion wurden auf 7,5 %ige Gele mit den Abmessungen 0,6 x 7,4 cm aufgetragen und etwa 2 - 3 Stunden bei 5 mA/Gel der Elektrophorese in dem beschriebenen diskontinuierlichen Puffersystem unterworfen. Die Gelelektrophorese wurde jeweils unterbrochen, wenn die Folgeionen, angezeigt durch eine Brechungsbande, das Gelende bis auf 1 mm erreicht hatten.

Die Proteinbanden wurden dann in einer wässrigen Lösung von 0,25 % Coomassie Blau - 9,2 % Essigsäure - 45,5 % Methanol durch achtstündige Behandlung gleichzeitig fixiert und angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Diffusion in einer wässrigen Lösung von 7,5 % Essigsäure - 35 % Methanol innerhalb von 2 - 3 Tagen entfernt.

5.2. Elution der enzymatischen Aktivität von DAVIS-Gelen

Ohne vorausgehende Vorelektrophorese ließ sich in den beschriebenen 7,5 %igen Gelen keine enzymatische Aktivität nachweisen. Dieses ist vermutlich auf eine Hemmung oder Inaktivierung des Enzyms durch nicht polymerisiertes Acrylamid und Methylenbisacrylamid bzw. auf Ammoniumperoxosulfat zurückzuführen.

Daher wurden die Gele vor dem Auftragen der Enzymprobe über Nacht bei 1 mA/Gel mit Trenngelpuffer vorelektro-

phoresiert. Anschließend wurde die Elektrophorese in der Kälte, wie zuvor beschrieben, durchgeführt, das Glasröhrchen in eine Spritze eingespannt und das Gel durch einen Stempel kontinuierlich durch ein Sieb gedrückt und fraktioniert. Die Gelpartikel wurden 2 Stunden in 400 μ l Puffer A im Kühlraum geschüttelt und nach Korrektur des pH-Wertes auf enzymatische Aktivität untersucht.

5.3. SDS-Acrylamid Gelelektrophorese

Analytische SDS-Gelelektrophoresen wurden nach SHAPIRO et al. (61) mit den Änderungen von WEBER und OSBORN (62) durchgeführt. Etwa 30 μ g der Enzympräparation nach Hydroxyapatitchromatographie wurden auf 10 %ige Gele mit den Abmessungen 0,6 x 7,4 cm aufgetragen und 12-14 Stunden mit 8 mA/Gel der Elektrophorese in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7 unterworfen. In Parallelgelen wurde eine Eichung mit Albumin, Ovalbumin und Chymotrypsinogen durchgeführt.

Fixierung, Färbung und Entfärbung der Gele wurde wie vorher beschrieben durchgeführt.

6. Kettenlängenbestimmung der Endprodukte der Enzymreaktion

In Sephadex Dextrangelen steht das Elutionsvolumen von Polymeren und die Kettenlänge in einem mathematischen Zusammenhang. Für Oligo- und Polynukleotide ist diese Abhängigkeit von STANLEY (37) untersucht worden. Es ergibt sich dabei folgende Beziehung

$$MG = A - B \times \lg K$$

A und B sind dabei Konstanten des jeweiligen Sephadex Geltyps. Für die Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadex G-25 fine gilt nach STANLEY

$$MG = 150 - 3,84 \times 10^3 \lg K$$

K stellt den R_f -Wert eines Oligonukleotids mit dem Elutionsvolumen V dar und läßt sich aus folgender Beziehung errechnen

$$K = \frac{V - V_{ex}}{V_{inc} - V_{ex}}$$

Das Ausschlußvolumen V_{ex} und das innere Säulenvolumen V_{inc} sind Konstanten einer Säule und lassen sich mit dem Polymer Dextranblau (V_{ex}) und NaCl (V_{inc}) bestimmen. Sephadex G-25 fine wurde bei 25°C in 0,5 M Ammoniumbikarbonat pH 8,6 gequollen. Durch fünfmalige Finesentfernung wurde die Gelpartikelgröße so standardisiert, daß nur solche verwendet wurden, welche innerhalb von 30 Minuten mehr als 15 cm sedimentieren. Die erhaltene Gelsuspension wurde in eine Säule (1 x 50 cm) gefüllt und mit 8 M Harnstoff, 0,5 M Ammoniumkarbonat Puffer pH 8,6 mehrere Tage bis zur Volumenkonstanz gewaschen.

Dann wurde das Ausschlußvolumen V_{ex} mit 13,05 ml und das Säuleninnenvolumen V_{inc} mit 34,9 ml bestimmt. Folgender Enzymsatz wurde 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert:

DNA : RNA Hybrid (5 µg RNA = $2,5 \times 10^5$ cpm)	100 µl
MgSO ₄ (0,18 M)	17 µl
Ribonuklease H (100 E)	50 µl
Puffer A	350 µl
	517 µl

Anschließend wurde die Reaktion durch fünfminütiges Kochen bei 95°C im Wasserbad gestoppt und damit gleichzeitig eventuell noch hybridisierte RNA aus dem Komplex befreit.

Der Ansatz wurde schnell in Eiswasser abgekühlt, um Renaturierungen zu verhindern, und dann mit festem Harnstoff und Ammoniumbikarbonat bis zu den gewünschten Konzentrationen versetzt. Anschließend wurde die Probe mit einem Volumen von 300 μ l unter Zusatz von 250 μ g AMP als inneren Marker in der vorbereiteten Sephadex G-25 fine Säule chromatographiert. Es wurden Fraktionen von 15 Tropfen = 0,87 ml bei einer Pufferfließgeschwindigkeit von 2 ml/h gesammelt. Nach dem Verdünnen der Fraktionen mit 4 ml Wasser wurden jeweils 4 ml entnommen, mit 20 ml Bray's (38) Lösung versetzt und nach 24-stündigem Stehen in der Dunkelheit im Scintillationszähler die Radioaktivität bestimmt.

7. Spaltung der 3'-Phosphodiesterbindung und Basenspezifität

7.1. Synthese des doppeltmarkierten Hybrids

Die Synthese des ^{14}C -Guanidin und ^3H -Uridin markierten Hybrids wurde in folgendem Inkubationsansatz mit E.-Coli RNA Polymerase (Boehringer) bei 37°C durchgeführt.

CTP, GTP, ATP, UTP $3 \times 10^{-3}\text{M}$	1,0 ml
Kalbsthymus DNA (denaturiert, 2 mg/ml)	0,3 ml
KCl (0,6 M)	0,25 ml
MnCl ₂ (0,1 M)	0,3 ml
Mercaptoäthanol (0,05 M)	
Tris-HCl (0,03 M) pH 7,9	0,7 ml
^{14}C -GTP (38 mCi/mM) 15 μ Ci	0,3 ml
^3H -UTP (5 mCi/0,11 mg) 90 μ Ci	0,18 ml
E.-Coli RNA Polymerase 20 E	0,02 ml
	3,05 ml

Nach dreistündiger Synthese wurde das Hybrid, wie schon beschrieben, von Proteinen befreit und über Biogel A-1,5 m gereinigt. Anschließend wurde es mit 3 Volumina Äthanol gefällt, getrocknet und in 400 μ l 30 mM Tris-HCl Puffer pH 7,9 gelöst.

7.2. Chromatographie der enzymatischen Spaltprodukte nach alkalischer Hydrolyse auf PEI - Zellulose

Je 100 μ l dieses Hybrids wurden mit 50 μ l = 100 E Enzym bzw. Tris-HCl Puffer pH 7,9 als Kontrolle 1 Stunde in einem Mikroreagenzglas inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Erhitzen auf 100°C gestoppt, der Ansatz aber weiter bei 80°C zum Einengen belassen. Die Volumina wurden gemessen, durch Zugabe von Wasser angeglichen und mit 2,5 μ l 1 M KOH Lösung (0,05 M im Ansatz) versetzt. Anschließend wurden beide Reagenzgläser verschmolzen, und die RNA bei 105°C in 40 Minuten im Trockenschrank hydrolysiert. Beide Ansätze wurden mit 10 %iger PCA (W/W) neutralisiert. Jeweils 40 μ l wurden auf eine PEI-Zellulosefolie bandförmig aufgetragen und aufsteigend mit 0,35 M LiCl 50 Minuten lang chromatographiert. Als Marker waren Uridintriphosphat anstelle von Nukleosiddiphosphat und die entsprechenden Nukleoside (U,G) und Monophosphate (Up, Gp) mitgelaufen. Nach einer Laufstrecke von 13 cm ergaben sich folgende R_f -Werte:

pUp	0	Up	0,25
pGp	0	G	0,25
Gp	0,12	U	0,72

Von den radioaktiven Chromatogrammen wurden 0,5 cm breite Abschnitte von den Folien abgekratzt und in Scintillationsgläschen überführt. Die Nukleotide wurden in den Gläschen mit 3 ml 0,7 M $MgCl_2$ von den Zelluloseaustauscherpartikeln abgelöst und ihre Radioaktivität nach Zusatz von 20 ml Bray's (38) Lösung im Scintillationszähler bestimmt.

8. Isoelektrische Fokussierung

Wenn eine Mischung aus Trägerampholyten mit niedrigem Molekulargewicht in einer konvektionsfreien wässrigen Lösung einer elektrischen Spannung ausgesetzt wird, bildet sich ein pH-Gradient.

Ampholyte mit hohem Molekulargewicht z.B. Proteine konzentrieren sich unter diesen Bedingungen in schmalen Zonen am isoelektrischen Punkt, dem pH-Wert, bei dem ihre Nettoladung gleich Null ist, und keine Wanderung mehr stattfindet.

Dieser Versuch wurde mit einer LKB 8101 Ampholine Elektrofokussierungssäule im pH-Bereich von 3 - 10 durchgeführt.

1. Elektrodenschutzlösungen

a) Kathode: 0,2 ml Äthylamin wurden mit 10 ml dest. H_2O gemischt

b) Anode: 0,2 ml H_2SO_4 konz. wurden mit 14,0 ml dest H_2O gemischt, in der Mischung wurden 12,0 g Sucrose gelöst

(a = leichte Elektrodenlösung, b = dichte Elektrodenlösung)

2. Lösungen für den Gradientenmischer

a) 1,9 ml Trägerampholine wurden mit 38,5 ml 90 %igem Glycerin und 14,5 ml dest. H_2O gemischt

(Volumen ca. 55 ml)

b) 0,6 ml Trägerampholine wurden mit 4 ml Enzymlösung
(DE-52) und 50 ml 5 %igem Glycerin gemischt
(a = dichte Lösung, b = leichte Lösung)

Die Durchführung des Versuches wurde nach den Vorschriften
des Herstellers vorgenommen. Der Proteingehalt der einge-
setzten Enzymprobe betrug 500 µg/ml, 6 ml der Reinigungs-
stufe DE-52 wurden verwendet.

Daten: Trägerampholinekonzentration 1 %

Protein 3 mg

Anfangsspannung 300 V

Stromstärke 0,3 mA

Temperatur 2°C

Säulenvolumen 110 ml

Versuchsdauer 72 Stunden

Der Gradient wurde mit einer peristaltischen LKB Pumpe ab-
gesaugt und fraktioniert. Es wurden 3 ml Fraktionen
gesammelt, aus diesen wurde ohne Dialyse die enzymatische
Aktivität wie beschrieben bestimmt.

VI LITERATUR

1. Stein,H, Hausen P., (1969) Science, 166, 393-395
2. Hausen,P, Stein,H. (1970) Eur.J.Biochem., 14, 278-283
3. Keller,W.E., Crouch,R. (1972) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 69, 3360-3364
4. Stavrianopoulos,J.G., Chargaff,E.(1973) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 70, 1959-1963
5. Wyers, F., Sentenac, A., Fromageot, P., (1973) Eur.J. Biochem., 35, 270-281
6. Doenecke,D., Marmaras,V.J., Sekeris, C.E. (1972) FEBS Lett., 22, 261-264
7. Mölling,K., Bolognes, D.P., Bauer, H., Büsen, W., Plassmann, H.W., Hausen, P. (1971) Nature New Biology 234, 240-243
8. Spiegelmann,S., Hall,B.D., Storck,R. (1961) Proc.Nat. Acad.Sci. USA 47, 1135-1140
9. Schulmann,H.M., Bonner, D.M. (1962), Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 48, 53-62
10. Sibatani,A., De Kloet,S.R., Allfrey,V.G., Mirsky, A.E. (1962) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 48, 471-477
11. Konrad,M.W., Stent,G.S. (1964) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 51, 647-653
12. Mead,G.G. (1964) J.Biol.Chem., 239, 550-554
13. Chamberlin,M., Baldwin,R.L., Berg, P. (1963) J.Mol.Biol., 7, 334-349
14. Geiduschek,E.P., Nakamoto,T., Weiss,S. (1961) Proc.Nat. Acad.Sci. USA, 47, 1405-1415
15. Doerfler,W., Zillig, W., Fuchs,E., Albers (1962) Physiol. Chem., 330, 93-123
16. Warner,R.C., Samuels, H.H., Abbott,M.T., Krakow,J.S. (1963) Proc.Nat.Acad.Sci. USA,49, 533-538
17. Chamberlin,M., Berg,P. (1964) J.Mol.Biol., 8, 297-313
18. Sinsheimer,R.L., Lawrence,M. (1964) J.Mol.Biol.,8, 289-296
19. Bassel,A., Hayashi,M., Spiegelmann,S. (1964) Proc.Nat. Acad.Sci. USA, 52, 796-804
20. Temin,H.M., Mizutani,S. (1970) Nature, 226, 1209-1213

21. Spiegelmann, S., Burny, A., Das, M.R., Keydar, J., Schlom, J.,
Travnicek, M., Watson, K., (1970) *Nature*, 227, 563-567
22. Rokutanda, M., Rokutanda, H., Green, M., Fujinaga, K.,
Ray, R.K., Gurgo, C. (1970) *Nature*, 227, 1026-1028
23. Fujinaga, K., Parsons, J.T., Beard, J.W., Beard, D.,
Green, M. (1970) *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*, 67, 1432-1439
24. nicht veröffentlichte Ergebnisse
25. Sugino, A., Hirose, S., Okazaki, R. (1972) *Proc.Nat.Acad.
Sci. USA*, 69, 1863-1867
26. Britton, R.J., Davidson, E.H. (1969) *Science*, 165, 349-357
27. McCarthy, B.J., Hoyer, B.H. (1964) *Proc.Nat.Acad.Sci.
USA*, 52, 915
28. Gurdon, J.B. (1962) *Develop.Biol.*, 4, 256
29. Allfrey, V.G., Mirsky, A.E. (1958) *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*
44, 981
30. Bonner, J., Dahmus, M.E., Farmbrough, D., Huang, K.C.,
Marushige, K., Yuan, Y.H. (1968) *Science*, 159, 47
31. Paul, J., Gilmour, R.S. (1966) *Nature*, 210, 992
32. McCarthy, B.J., Hoyer, B.H. (1964) *Proc.Nat.Acad.Sci.
USA*, 52, 915
33. Stavrianopoulos, J.G., Karkas, J.D., Chargaff, E. (1972)
Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 69, 2609-2613
34. Bishop, J.O. (1969) *Biochem.Biophys.Acta*, 174, 636-652
35. Szybalski, W. (1967) *Information Exchange Group No.7
für Methods in Enzymol. "Nucleic Acids"*
36. Davis, B.J. (1964) *Ann.N.Y.Acad.Sci*, 21, 404
37. Stanley, W.M. (1967) *Methods in Enzymol. Vol. XII, A*, p.404
38. Bray, G.A. (1960) *Anal.Biochem.*, 1, 279
39. persönliche Mitteilung
40. Riley, M., Maling, B., Chamberlin, J. (1966) *J.Mol.Biol.*
20, 359
41. Futai, M., Mizuno, D. (1967) *J.Biol.Chem.*, 242, 5001-5037
42. Beard, J.R., Razell, W.E. (1964) *J.Biol.Chem.*, 239, 4186-4193

43. Walker, P.M.B. (1969) Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Band 9, S. 304
44. Robertson, H.D., Webster, R.E., Zunder, N.D. (1968) J.Biol.Chem., 243, 82
45. unveröffentlichte Ergebnisse
46. Harvey, C., Malsman, L., Nussbaum, A.L. (1967) Biochemistry, 6, 3689
47. Udvardy, J., Marre, E., Farkas, G.L. (1970) BBA, 206, 392
48. Shuster, L., Khorana, H.G., Heppel, L.A. (1959) BBA, 33, 452
49. Tuve, T.W., Anfinsen, C.B. (1960) J.Biol.Chem., 235, 3437
50. Lark, K.G. (1972) J.Mol.Biol., 64, 47-60
51. Schekman, R., Wickner, W., Westergaard, O., Brutlag, D., Geider, K., Bertsch, L.L., Kornberg, A. (1972) Proc. Nat.Acad.Sci. USA, 69, 2691-2695
52. Keller, W. (1972) Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 69, 1560-1564
53. Levin, O. (1962) Methods in Enzymology, Vol V, p. 27
54. Zillig, W., Fuchs, E., Milette, R.L., in "Procedures in Nucleic Acid Research", G.C. Cantoni, D.L. Davis, eds., p. 323, Harper & Row, New York (1966)
55. Lowry, O.H., Roserough, N.J., Farr, A.L., Randall, J.R. (1951) J.Biol.Chem., 193, 265
56. Burton, K. (1956) Biochem.J., 63, 315
57. Ogur, M., Rosen, G. (1950) Arch.Biochem., 25, 262
58. Mohr, F. (1856) Ann.Chem.Pharm., 97, 335
59. Sekeris, C.E., Beato, M., Homoki, J., Congote, L.F. (1968) Hoppe Seyler Z. Physiol.Chem., 349, 857
60. Martin, R.G., Ames, B.N. (1960) J.Biol.Chem., 236, 1372-1379
61. Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V. (1967) Biochem. Biophys.Res.Comm., 28, 815
62. Weber, K., Osborn, M. (1969) J.Biol.Chem., 244, 4406

LEBENS LAUF

Am 18.02.1945 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Walter Röwekamp und seiner Ehefrau Marija, geborene Stankovič, in Wien geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Berswordt-Schule und anschließend das Humboldt-Gymnasium in Dortmund. Nach der Reifeprüfung im Jahre 1964 war ich zwei Jahre als Apothekerpraktikant ebenfalls in Dortmund in der Bären-Apotheke tätig.

Anschließend nahm ich das Pharmaziestudium in Frankfurt/Main auf, wechselte nach einem Jahr nach Marburg und legte dort 1969 die pharmazeutische Staatsprüfung ab.

Im April 1970 begann ich die Doktorarbeit im Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität in Marburg.

Seit dem Ende desselben Jahren bin ich mit Rosemarie Heymann verheiratet.

MARBURG November 1973

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe Prof. Karlson/Sekeris unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. C.L. Sekeris in der Zeit von April 1970 bis Oktober 1973.

